

**OPTIMASI MEDIA SOL-GEL UNTUK IMOBILISASI  
ENZIM ASETILKOLINESTERASE DENGAN TEKNIK *ENTRAPMENT*  
SEBAGAI APLIKASI BIOSENSOR PENDETEKSI PESTISIDA**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**Fadhilla Setya Rahayu**

**135100107111001**



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

## LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Skripsi : Optimasi Media Sol-gel untuk Imobilisasi Enzim  
Asetilkolinesterase dengan Teknik *Entrapment*  
sebagai Aplikasi Biosensor Deteksi Pestisida

Nama Mahasiswa : Fadhilla Setya

NIM : 135100107111001

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Pembimbing I



**Dr. Ir. Tri Dewanti W., M.Kes**

NIP 196108181987032001

Tanggal Persetujuan:

.....

Dosen Pembimbing II



**Sudarma Dita W., STP, M.Sc, MP.**

NIK 201201 840924 2 001

Tanggal Persetujuan:

.....

## LEMBAR PENGESAHAN

Judul Skripsi : Optimasi Media Sol-gel untuk Imobilisasi Enzim  
Asetilkolinesterase dengan Teknik *Entrapment* sebagai  
Aplikasi Biosensor Pendeteksi Pestisida  
Nama Mahasiswa : Fadhilla Setya Rahayu  
NIM : 135100107111001  
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian  
Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Penguji I,

  
Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP., MP.

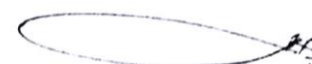
NIP. 19700504 199903 2 002

Dosen Penguji II,

  
Dr. Ir. Tri Dewanti W., M.Kes.

NIP. 19610818 198703 2 001

Dosen Penguji III,

  
Sudarma Dita W., STP, M.Sc, MP.

NIK 201201 840924 2 001



Prof. Dr. Teti Estiasih, STP., MP.

NIP 19701226 200212 2 001

Tanggal Lulus :

## RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Fadhillah Setya Rahayu lahir di Malang, 14 Juni 1995. Penulis merupakan anak kedua dari ayah yang bernama Sutiyo dan Ibu Sri Rahayu. Selain itu penulis mempunyai dua saudara yaitu Lolytia Putri Permana dan Afifa Salsabila. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SDN Percobaan I Malang pada tahun 2007, kemudian melanjutkan ke Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 8 Malang dengan kelulusan pada tahun 2010, lalu melanjutkan ke Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 4 Malang dengan kelulusan pada tahun 2013.

Pada bulan Januari tahun 2018 penulis telah berhasil menyelesaikan pendidikannya di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang dengan judul penelitian Optimasi Media Sol-gel untuk Imobilisasi Enzim Asetilkolinesterase dengan Teknik *Entrapment* sebagai Aplikasi Biosensor Pendeteksi Pestisida.

Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu, dan boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu, padahal ia amat buruk bagimu, Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.

**(Q.S Al-Baqarah 216)**

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain. Dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap. **(Q.S Al-Insyirah 6-8)**

## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama Mahasiswa : Fadhilla Setya Rahayu  
NIM : 135100107111001  
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian  
Fakultas : Teknologi Pertanian  
Judul Skripsi : Optimasi Media Sol-gel untuk Imobilisasi Enzim  
Asetilkolinesterase dengan Teknik *Entrapment* sebagai  
Aplikasi Biosensor Pendeteksi Pestisida.

Menyatakan bahwa,

Skripsi dengan judul di atas merupakan karya asli penulis serta Dr. Ir. Tri Dewanti W., M.Kes. dan Sudarma Dita Wijayanti, STP., MP., M.Sc. selaku dosen pembimbing. Apabila dikemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar, saya bersedia dituntut sesuai hukum yang berlaku.

Malang, Januari 2018

Pembuatan Pernyataan,

Fadhilla Setya Rahayu  
NIM. 135100107111001

**FADHILLA SETYA RAHAYU. 13510010711001 . Optimasi Media Sol-Gel untuk Imobilisasi Enzim Asetilkolinesterase dengan Teknik *Entrapment* Sebagai Aplikasi Biosensor Pendeteksi Pestisida. Skripsi. Pembimbing I: Dr.Ir Tri Dewanti W., M.Kes. Pembimbing II: Sudarma Dita W., STP, MP M.Sc.**

---

## **RINGKASAN**

Sayuran merupakan salah satu komoditas hortikultura yang rentan terserang hama dan penyakit tanaman. Akibatnya, banyak petani di Indonesia yang menggunakan pestisida secara berlebihan untuk menjaga mutu sayuran. Hal ini dapat meninggalkan residu pestisida pada sayuran. Apabila sayuran dengan residu pestisida tersebut dikonsumsi, akan menimbulkan akumulasi di dalam tubuh yang menimbulkan peningkatan aktivitas syaraf seperti sesak nafas, kejang otot hingga mengakibatkan kelumpuhan. Sehingga keberadaan residu pestisida penting dilakukan, salah satunya yaitu menggunakan alat GC-MS, *spray mass spectroscopy* dan HPLC. Namun ketiga metode tersebut memiliki kelemahan diantaranya alat mahal, membutuhkan waktu yang lama, dan umumnya dilakukan oleh teknisi laboratorium.

Oleh karena itu, diperlukan inovasi alat deteksi residu pestisida dengan aplikasi lebih mudah dan terjangkau untuk masyarakat. Salah satunya yaitu dengan memanfaatkan teknologi biosensor kolorimetri. Enzim asetilkolinesterase merupakan salah satu biomolekul yang dapat mendeteksi keberadaan pestisida. Imobilisasi enzim dengan teknik *entrapment* (penjebakan) dalam media sol-gel merupakan salah satu metode yang dapat mempertahankan aktivitas enzim. Untuk mengoptimalkan media sol-gel dalam mempertahankan jumlah dan aktivitas enzim asetilkolinesterase, maka dilakukan optimasi rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O serta konsentrasi NaOH sebagai katalis pembentukan silika dalam sol-gel. Optimasi tersebut dilakukan dengan menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) metode *Central Composite Design* (CCD).

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa optimasi sol-gel untuk faktor rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O adalah 1:8,58 sedangkan untuk faktor konsentrasi NaOH adalah 4,09 mM. Dari optimasi sol-gel tersebut didapatkan jumlah enzim asetilkolinesterase yang terimobilisasi sebesar  $84,09 \pm 3,21\%$  sedangkan aktivitas enzim yang didapat yaitu  $70,45 \pm 3,81\%$ . Enzim asetilkolinesterase yang diimobilisasi dengan sol-gel tersebut kemudian diaplikasikan untuk biosensor pendeteksi pestisida dan didapatkan hasil limit deteksi pestisida profenofos sebesar 1 ppm, waktu respon minimal untuk bereaksi dengan substrat yaitu 4 menit. Suhu terbaik untuk penyimpanan biosensor yaitu pada suhu -4°C. Setelah dilakukan penyimpanan selama 5 hari, jumlah dan aktivitas relatif enzim asetilkolinesterase mengalami penurunan masing-masing sebanyak 2,02% dan 2,40%.

**Kata Kunci :** Asetilkolinesterase, Biosensor, Pestisida, Sol-gel

## **SUMMARY**

*Vegetable is one of horticulture commodities that susceptible to pest and disease. Therefore, many horticulture farmers in Indonesia tend to use a lot of pesticide to maintain their vegetables quality. This action could leave pesticide residues in vegetables. If pesticide residue was consumed, it can make accumulation in human body and increased nerve activity such as shortness of breath, muscle spasms to cause paralysis. So, it is important to analyze pesticide residue in vegetables. One of the detectors that can analyze pesticide residue are GC-MS, spray mass spectroscopy and HPLC. But, these three detectors have disadvantages such as the detector is expensive, the analysis takes a long time, and generally done by a laboratory technician.*

*Therefore, it is necessary to make a new innovation of pesticide residue detector with simple application and affordable for consumer. Colorimetric biosensor is one of the technologies that are more simple and easy to use by consumer. Acetylcholinesterase is a biomolecule that can detect pesticide residue. Immobilization of enzyme with entrapment technique in sol-gel media is a method that can maintain the enzyme activity. To develop sol-gel media in order to maintain the amount and activity of immobilized acetylcholinesterase enzyme, the optimization of molar ratio TEOS and H<sub>2</sub>O and NaOH concentration as a catalyst of silica should be studied. The optimization used Response Surface Methodology (RSM) with Central Composite Design (CCD) method.*

*Based on the result of the research, the optimum molar ratio of TEOS and H<sub>2</sub>O was 1:8,58, while the optimum concentration of NaOH was 4,09 mM. The optimum sol-gel obtained amounts of immobilized enzyme was 84,09 ± 3,21% and relative activity of immobilized enzyme was 70,45 ± 3,81%. An immobilized acetylcholinesterase was then applied to a pesticide biosensor and the limit of detection of profenofos pesticide was 1 ppm, the minimum response time to react with the substrate was 4 minutes. The best temperature for biosensor storage was at -4°C. After 5 days of storage, the amounts and relative activity of immobilized acetylcholinesterase decreased by 2.02% and 2.40%, respectively.*

**Keywords :** *Acetylcholinesterase, Biosensor, Pesticide, Sol-gel*



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena berkat rahmat dan anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan Proposal Skripsi ini.

Proposal ini berjudul “Optimasi Media Sol-gel untuk Imobilisasi Enzim Asetilkolinesterase dengan Teknik *Entrapment* sebagai Aplikasi Biosensor Deteksi Pestisida”. Penyusunan Proposal ini merupakan salah satu syarat untuk menempuh penelitian dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian.

Pada kesempatan ini penyusun ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Ir. Tri Dewanti W., M.Kes. selaku dosen pembimbing I dan Ibu Sudarma Dita Wijayanti, STP, M.Sc, MP. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan arahan, bimbingan, ilmu dan pengetahuannya kepada penyusun
2. Ibu Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP., MP selaku dosen penguji
3. Ibu Prof. Dr. Teti Estiasih, STP., MP. selaku Ketua Jurusan THP
4. Kedua orang tua, Sutiyo dan Sri Rahayu serta ketiga saudara, Lolytia Putri, Afifa Salsabila dan Lalu Heru Purnawan yang selalu memberi dorongan, doa, nasehat serta motivasi agar skripsi ini segera terselesaikan
5. Devitasari Dian Pratiwi, Anis Lucky, Rizky Fauziyah, Ayu Irhoni, Rachmania Mirza, Dila Rahmawati, Husnul Latifah, Firdanita Salsabella, Adhelia Christina, dan Dodik Budianto yang selalu memberikan dukungan dan semangat selama perkuliahan dan dalam penelitian tugas akhir
6. Mbak Vita dan Mbak Citra serta laboran lainnya yang telah banyak membantu saat melakukan penelitian di laboratorium
7. Achmad Rizal Febrianzah, Gita Dwi Cahyani, Meidy Odiyani dan Restu E. yang selalu memberi semangat dan doa untuk penyelesaian skripsi ini

Penulis mengakui bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat beberapa kesalahan. Oleh dari itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi perbaikan dan penyempurnaan skripsi ini.

Malang, Januari 2018  
Penyusun,

Fadhilla Setya

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
HALAMAN PERUNTUKKAN.....	v
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI. ....	vi
RINGKASAN.....	vii
SUMMARY.....	viii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
 <b>I. PENDAHULUAN .....</b>	 <b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
1.5 Hipotesis .....	3
 <b>II. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	 <b>4</b>
2.1 Pestisida .....	4
2.2 Biosensor .....	9
2.3 Asetilkolin (ACh) .....	13
2.4 Asetilkolinesterase (AChE) .....	14
2.5 Imobilisasi Enzim .....	16
2.6 Sol-gel .....	17
2.7 Tetraortosilikat (TEOS) .....	18
2.8 Polietilen Glikol (PEG).....	19
2.7 <i>Indoxyl Acetate</i> .....	20
2.7 <i>Metode Response Surface Methodology</i> .....	20
 <b>III. METODE PENELITIAN .....</b>	 <b>22</b>
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan .....	22
3.2 Alat .....	22
3.3 Bahan .....	22
3.4 Metodologi Penelitian .....	22
3.5 Tahap Pengujian Kualitas Biosensor .....	26
3.5 Diagram Alir .....	29
 <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	 <b>34</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>40</b>

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 2.1</b> Klasifikasi Tingkat Bahaya Pestisida Menurut WHO .....	8
<b>Tabel 2.2</b> Enzim Pendeteksi Pestisida .....	11
<b>Tabel 2.3</b> Biosensor Pendeteksi Pestisida .....	13
<b>Tabel 2.4</b> Aplikasi Kertas Whatman No. 1 Sebagai Biosensor .....	23
<b>Tabel 3.1</b> Nilai Kode dan Non-kode Rancangan Percobaan Metode RSM ..	27
<b>Tabel 3.2</b> Hasil Rancangan Percobaan Metode RSM .....	28
<b>Tabel 3.3</b> Data Volume TEOS dan H <sub>2</sub> O Pada Setiap Rancangan .....	29
<b>Tabel 4.1</b> Pengaruh Jenis Kertas Terhadap Absorbansi Buffer Rendaman	50
<b>Tabel 4.2</b> Hasil Analisa Respon Rancangan RSM .....	56
<b>Tabel 4.3</b> Hasil Analisa Ragam (ANOVA) dari Model <i>Quadratic</i> Respon Jumlah Enzim Terimobilisasi .....	61
<b>Tabel 4.4</b> Hasil Analisa Ragam (ANOVA) dari Model <i>Quadratic</i> Respon Aktivitas Relatif Enzim Terimobilisasi .....	28
<b>Tabel 4.6</b> Perbandingan Hasil Verifikasi dengan Prediksi .....	72
<b>Tabel 4.7</b> Hasil Pengujian <i>Limit of Detection</i> (residu pestisida profenofos)...	74
<b>Tabel 4.8</b> Hasil Pengujian Waktu Respon Biosensor Terhadap <i>Indoxyl</i> <i>Acetate</i> .....	77
<b>Tabel 4.9</b> Hasil Stabilitas Biosensor Terhadap Suhu .....	79
<b>Tabel 4.10</b> Hasil Analisa t-Test Stabilitas Jumlah Enzim Terimobilisasi Terhadap Suhu .....	80
<b>Tabel 4.11</b> Hasil Analisa t-Test Stabilitas Aktivitas Relatif Enzim Terimobilisasi Terhadap Suhu .....	81
<b>Tabel 4.12</b> Hasil Analisa Biosensor Terhadap Waktu .....	82
<b>Tabel 4.13</b> Hasil Analisa t-Test Stabilitas Jumlah Enzim Terimobilisasi Terhadap Waktu .....	83
<b>Tabel 4.14</b> Hasil Analisa t-Test Stabilitas Aktivitas Relatif Enzim Terimobilisasi Terhadap Suhu .....	83
<b>Tabel 4.15</b> Hasil Visualisasi dan Rerata Nilai " <i>Mean</i> " untuk Uji Akurasi .....	85
<b>Tabel 4.16</b> Hasil Visualisasi dan Rerata Nilai " <i>Mean</i> " Biosensor ditambah 1 dan 2 ppm .....	86
<b>Tabel 4.17</b> Rerata Nilai " <i>Mean</i> " dan Visualisasi Biosensor pada Aplikasi Selada Organik .....	88
<b>Tabel 4.15</b> Hasil Aplikasi Biosensor untuk Deteksi Pestisida di Pasar Dinoyo.....	89

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b> Struktur Kimia Pestisida Golongan Organoklorin .....	5
<b>Gambar 2.2</b> Struktur Kimia Organofosfat .....	5
<b>Gambar 2.3</b> Struktur Kimia Pestisida Golongan Organofosfat .....	6
<b>Gambar 2.4</b> Struktur Kimia Karbamat .....	6
<b>Gambar 2.5</b> Struktur Kimia Pestisida Golongan Karbamat.....	7
<b>Gambar 2.6</b> Struktur Kimia Pestisida Golongan Piretroid.....	7
<b>Gambar 2.7</b> Skema Biosensor .....	10
<b>Gambar 2.8</b> Klasifikasi Biosensor .....	11
<b>Gambar 2.9</b> Struktur Kimia Asetilkolin.....	13
<b>Gambar 2.10</b> Mekanisme Organofosfat dalam Menghambat Asetilkolinesterase.....	15
<b>Gambar 2.11</b> Ilustrasi Metode Imobilisasi Enzim.....	17
<b>Gambar 2.12</b> Prinsip Pembentukan Sol-gel .....	19
<b>Gambar 2.13</b> Reaksi Hidrolisis <i>Indoxyl Acetate</i> oleh Enzim Asetilkolinesterase.....	19
<b>Gambar 3.1</b> Desain <i>Platform</i> Biosensor .....	34
<b>Gambar 3.2</b> Diagram Alir Penelitian Tahap I.....	39
<b>Gambar 3.3</b> Diagram Alir Penelitian Tahap II .....	40
<b>Gambar 3.4</b> Diagram Alir Penentuan Jumlah Enzim Bebas .....	40
<b>Gambar 3.5</b> Diagram Alir Penentuan Jumlah Enzim Terimobilisasi .....	41
<b>Gambar 3.6</b> Diagram Alir Penentuan Aktivitas Relatif Enzim Bebas .....	42
<b>Gambar 3.7</b> Diagram Alir Penentuan Aktivitas Relatif Enzim Terimobilisasi .....	43
<b>Gambar 3.8</b> Diagram Alir Preparasi <i>Platform</i> .....	44
<b>Gambar 3.9</b> Diagram Alir Preparasi Sol-gel .....	44
<b>Gambar 3.10</b> Diagram Alir Imobilisasi Enzim .....	45
<b>Gambar 3.11</b> Diagram Alir Fabrikasi Biosensor .....	45
<b>Gambar 3.12</b> Diagram Alir Uji Kinetika Enzim Bebas dan Enzim Terimobilisasi.....	46
<b>Gambar 3.13</b> Diagram Alir Uji Biosensor pada Sayur Selada Organik .....	47
<b>Gambar 3.14</b> Diagram Alir Uji Biosensor pada Sampel Selada di Pasar Dinoyo .....	48
<b>Gambar 4.1</b> Hasil Konfirmasi Kerja Enzim Asetilkolinesterase .....	49
<b>Gambar 4.2</b> Visualisasi Ukuran Partikel TEOS dan Pori-pori antar Partikel Berdasarkan Jenis Katalis .....	52
<b>Gambar 4.3</b> Pengaruh Rasio Molar TEOS:H <sub>2</sub> O Terhadap Aktivitas Relatif Enzim Asetilkolinesterase Terimobilisasi .....	53
<b>Gambar 4.4</b> Pengaruh Konsentrasi NaOH (mM) Terhadap Aktivitas Relatif Enzim Asetilkolinesterase Terimobilisasi .....	55
<b>Gambar 4.5</b> Pengaruh Rasio Molar TEOS:H <sub>2</sub> O dan Konsentrasi NaOH (mM) Terhadap Jumlah Enzim Asetilkolinesterase Terimobilisasi.....	57
<b>Gambar 4.6</b> Pengaruh Rasio Molar TEOS:H <sub>2</sub> O dan Konsentrasi NaOH (mM) Terhadap Aktivitas Enzim Asetilkolinesterase Terimobilisasi.....	58
<b>Gambar 4.7</b> Kontur Plot dan Kurva Respon (3 Dimensi) Rasio Molar dan Konsentrasi NaOH pada Respon Jumlah Enzim Terimobilisasi .....	64
<b>Gambar 4.8</b> Kontur Plot dan Kurva Respon (3 Dimensi) Rasio Molar dan Konsentrasi NaOH pada Respon Aktivitas Relatif Enzim Terimobilisasi.....	70
<b>Gambar 4.9</b> Kurva Lineweaver-Burk Aktivitas Enzim Asetilkolinesterase Bebas .....	73
<b>Gambar 4.10</b> Kurva Lineweaver-Burk Aktivitas Enzim Asetilkolinesterase Terimobilisasi .....	73

<b>Gambar 4.11</b> Hasil Visualisasi Waktu Respon Biosensor .....	78
<b>Gambar 4.12</b> Regresi Linear Rerata <i>Mean</i> dengan Konsentrasi Pestisida 0,1, 2, 3, 4, dan 5 ppm .....	73

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Gambar Rancangan Desain Biosensor .....	96
<b>Lampiran 2.</b> Prosedur Analisa Data .....	96
<b>Lampiran 3.</b> Data Volume TEOS dan H <sub>2</sub> O pada Setiap Rancangan .....	101
<b>Lampiran 4.</b> Hasil Absorbansi Rancangan RSM .....	102
<b>Lampiran 5.</b> Hasil Perhitungan Pemilihan Model untuk Respon Jumlah Enzim Terimobilisasi .....	103
<b>Lampiran 6.</b> Hasil Perhitungan Pemilihan Model untuk Respon Aktivitas Enzim Terimobilisasi .....	104
<b>Lampiran 7.</b> Data Hasil Verifikasi .....	104
<b>Lampiran 8.</b> Data Analisa Kualitas Biosensor .....	105
<b>Lampiran 9.</b> Dokumentasi Penelitian .....	106

## I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara agraris yang memiliki kekayaan alam serta komoditas hortikultura seperti buah dan sayuran yang cukup besar sehingga dapat dijadikan sumber pendapatan baru di sektor pertanian seiring dengan tingginya permintaan buah dan sayuran dari negara tropis pada pasar internasional (Rukmana, 2003; Yusnani, 2013; Amilia *et al.*, 2016).

Pada umumnya petani tanaman hortikultura cenderung menggunakan pestisida secara berlebihan untuk meningkatkan mutu produknya. Penggunaan pestisida harus dilakukan secara tepat karena akumulasi zat kimia yang terdapat dalam pestisida dapat menimbulkan peningkatan aktifitas syaraf seperti sakit kepala, muntah, sesak nafas, kejang otot hingga mengakibatkan kelumpuhan (Alegantina *et al.*, 2005). Oleh karena itu, deteksi residu pestisida pada tanaman penting dilakukan untuk mengurangi resiko keracunan akibat residu pestisida. Beberapa metode yang telah dilakukan untuk mendeteksi residu pestisida adalah GC-MS, *spray mass spectroscopy* dan HPLC (Lan *et al.*, 2012; Kavruk *et al.*, 2013). Namun ketiga metode tersebut memiliki kelemahan diantaranya alat mahal, membutuhkan waktu yang lama, dan umumnya dilakukan oleh teknisi laboratorium (Badawy dan Aswad, 2014; So uza *et al.*, 2014).

Biosensor merupakan perangkat analitik yang dapat mengukur target analit secara kuantitatif atau semi-kuantitatif dengan memanfaatkan bioreseptor berupa enzim, antibodi, DNA, asam nukleat dan *whole cells* (Guo *et al.*, 2013). Biosensor berbasis enzim lebih banyak diaplikasikan karena memiliki spesifitas yang tinggi terhadap target analit. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa biosensor berbasis enzim asetilkolinesterase (AChE) dapat digunakan untuk mendeteksi residu pestisida pada sampel sayuran (Kavruk *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2013). Salah satu biosensor komersial untuk pendeteksi pestisida adalah ENZYTEC<sup>®</sup> (*Made in USA*), akan tetapi kelemahan dari biosensor tersebut adalah penggunaannya terbatas hanya untuk sampel air saja.

Dalam pembuatan biosensor, enzim digunakan dalam bentuk terimobilisasi atau enzim ditempatkan dalam suatu matriks padat dengan tetap mempertahankan aktivitas katalitiknya (Luckham dan Brennan, 2010). *Entrapment* (penjebakan) merupakan salah satu teknik imobilisasi enzim

dengan cara memperangkap enzim dalam matriks polimer yang berukuran mikro seperti sol-gel berbasis silika (So uza *et al.*, 2014).

Imobilisasi enzim dengan menggunakan media sol-gel memiliki beberapa keunggulan diantaranya yaitu pemerangkapan enzim dalam jumlah besar, stabil terhadap suhu tinggi, serta ukuran diameter pori-pori fleksibel atau dapat dikontrol (Lu *et al.*, 2009). Akan tetapi, penggunaan sol-gel untuk media imobilisasi enzim tersebut juga memiliki kelemahan yaitu struktur lapisan sol-gel sangat *porous* sehingga dapat menyebabkan enzim merembes keluar. Untuk mengatasi kelemahan tersebut dapat dilakukan dengan cara memodifikasi rasio molar antara silika (Tetraortosilika/TEOS) dengan H<sub>2</sub>O. Hal ini dikarenakan H<sub>2</sub>O digunakan pada proses hidrolisis TEOS sehingga rasio molar yang digunakan dapat mempengaruhi struktur TEOS pada pembentukan sol-gel.

Selain itu, faktor lain yang dapat digunakan untuk mengatur ukuran pori-pori sol-gel dapat dilakukan dengan modifikasi konsentrasi katalis. NaOH dapat mempercepat proses hidrolisis TEOS sehingga ukuran pori-pori sol-gel menjadi lebih besar dan enzim lebih mudah terperangkap (Soripotolou *et al.*, 2005). Menurut Verma (2011), sol-gel dengan katalis NaOH 3 mM dapat digunakan untuk mengimobilisasi enzim urase yang diaplikasikan menjadi biosensor kolorimetri pendeteksi urea.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan formulasi sol-gel berbasis silika yang tepat dengan faktor rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O serta konsentrasi NaOH (mM) sebagai media imobilisasi enzim asetilkolinesterase. Pada penelitian ini, dilakukan analisa jumlah enzim serta aktivitas relatif enzim terimobilisasi dilakukan untuk mengetahui efektivitas imobilisasi pada biosensor. Di mana semakin tinggi jumlah dan aktivitas enzim terimobilisasi tersebut maka semakin efektif sol-gel sebagai media imobilisasi enzim asetilkolinesterase serta dapat meningkatkan kualitas biosensor pendeteksi pestisida (Souza *et al.*, 2014).

Untuk meningkatkan hasil penelitian, maka digunakan metode statistik *Response Surface Methodology* (RSM) sehingga adanya interaksi antara parameter yang diteliti dengan respon yang dihasilkan dapat diketahui (Soarce *et al.*, 2003). Pada faktor rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O data minimum yang digunakan yaitu 1:4, data pusat yaitu 1:8, dan data unit maksimum 1:12. Sedangkan faktor konsentrasi NaOH data minimum yang digunakan yaitu 3mM, data pusat yaitu 4mM, dan data unit maksimum 5 mM.



## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana optimasi sol-gel dengan faktor rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O sebagai media *entrapment* enzim asetilkolinesterase?
2. Bagaimana optimasi sol-gel dengan faktor konsentrasi NaOH sebagai media *entrapment* enzim asetilkolinesterase?
3. Bagaimana pengaruh hasil optimasi rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O serta konsentrasi NaOH sebagai media *entrapment* enzim asetilkolinesterase terhadap jumlah dan aktivitas relatif enzim?
4. Bagaimana kualitas biosensor deteksi pestisida yang menggunakan sol-gel sebagai media *entrapment* enzim asetilkolinesterase serta aplikasinya pada sayur selada?

## 1.3 Tujuan

1. Mengetahui hasil optimasi sol-gel dengan faktor rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O sebagai media *entrapment* enzim asetilkolinesterase.
2. Mengetahui hasil optimasi sol-gel dengan faktor konsentrasi NaOH sebagai media *entrapment* enzim asetilkolinesterase?
3. Mengetahui pengaruh hasil optimasi rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O serta konsentrasi NaOH sebagai media *entrapment* enzim asetilkolinesterase terhadap dari jumlah dan aktivitas relatif enzim.
4. Mengetahui kualitas biosensor deteksi pestisida yang menggunakan sol-gel sebagai media *entrapment* enzim asetilkolinesterase serta aplikasinya pada sayur selada.

## 1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat diaplikasikan oleh masyarakat luas dalam mengontrol residu pestisida yang terdapat pada komoditas sayur selada secara cepat dan praktis.

## 1.5 Hipotesis

1. Diduga rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O serta konsentrasi NaOH yang optimal dapat menjadi media *entrapment* enzim asetilkolinesterase dan meningkatkan jumlah serta aktivitas enzim terimobilisasi.
2. Diduga rasio molar antara TEOS dan H<sub>2</sub>O serta konsentrasi NaOH yang tepat dapat meningkatkan kualitas biosensor deteksi pestisida

## II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Pestisida

#### 2.1.1 Definisi

Pestisida didefinisikan sebagai substansi kimia yang dapat digunakan untuk membunuh dan mengendalikan hama atau penyakit yang dapat merusak tanaman (WHO, 2006). Menurut USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) pestisida adalah suatu formulasi zat kimia yang digunakan untuk mencegah dan memusnahkan hama dalam bentuk hewan, tanaman dan mikroorganisme pengganggu (Soemirat, 2003 *dalam* Zulkanain, 2010).

Berdasarkan SK Menteri Pertanian RI Nomor 434.1/Kpts/TP270/7/2001, tentang Syarat dan Tata Cara Pendaftaran Pestisida menjelaskan bahwa pestisida adalah semua zat kimia atau bahan lain serta jasad renik dan virus yang digunakan untuk beberapa tujuan sebagai berikut:

- a. Memberantas atau mencegah hama dan penyakit yang merusak tanaman,  
bagian tanaman, atau hasil-hasil pertanian.
- b. Memberantas rerumputan.
- c. Mematikan daun dan mencegah pertumbuhan yang tidak diinginkan.
- d. Memberantas hama-hama air.

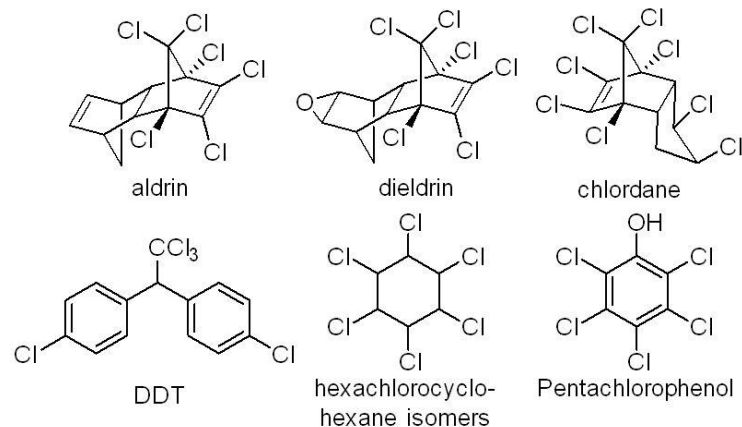
#### 2.1.2 Klasifikasi

Pestisida dapat diklasifikasikan berdasarkan komponen zat kimia yang terkandung di dalamnya. Tujuan dari penggolongan pestisida ini adalah untuk memberikan informasi mengenai efektivitas, sifat fisik dan kimia pestisida serta tindakan pencegahan yang perlu diperhatikan saat menggunakan pestisida tersebut. Berikut merupakan klasifikasi pestisida berdasarkan komponen zat kimia:

##### a. Organoklorin

Organoklorin adalah pestisida sintetik yang mengandung lima atau lebih atom klorin. Pestisida ini merupakan pestisida sintetik pertama digunakan dalam pertanian dan kesehatan masyarakat. Sifat pestisida ini memiliki volatilitas rendah, bahan kimianya yang stabil, larut dalam lemak dan bitransformasi serta biodegradasi lambat menyebabkan pestisida ini sangat

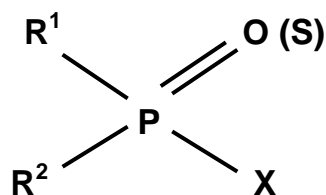
efektif untuk membasmi hama (Kegley *et al.*, 2008). Mekanisme kerja dari organoklorin yaitu mengganggu sistem saraf serangga sehingga mengakibatkan kelumpuhan hingga kematian pada serangga. Organoklorin memiliki dampak yaitu residu yang ditinggalkan dapat bertahan lama karena organoklorin ini resisten terhadap degradasi mikroorganisme. Beberapa contoh jenis dari pestisida golongan organoklorin adalah aldrin, dieldrin, chlordane, DDT, dan hexachlorocyclo-hexane isomer.



**Gambar 2.1** Struktur kimia pestisida golongan organoklorin (Kegley *et al.*, 2008).

#### b. Organofosfat

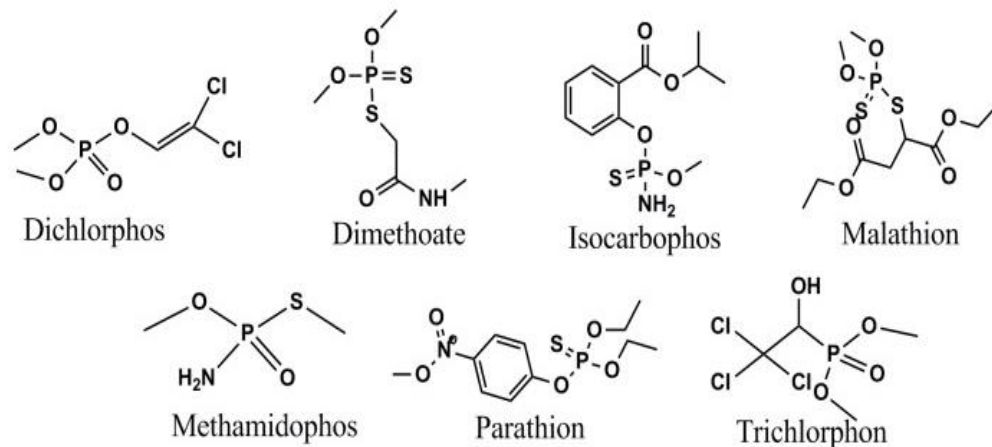
Organofosfat adalah insektisida yang memiliki struktur kimia yaitu gugus fosfat sebagai struktur utama,  $R^1$  dan  $R^2$  merupakan gugus metil atau etil, O pada gugus OX dapat digantikan oleh senyawa S dan gugus X dapat diisi oleh senyawa dari gugus manapun (Yaser dan Talal, 2011). Berikut merupakan struktur kimia dari organofosfat.



**Gambar 2.2** Struktur kimia organofosfat (Kegley *et al.*, 2008).

Organofosfat merupakan jenis insektisida yang memiliki tingkat toksisitas tinggi pada vertebrata maupun invertebrata. Hal ini dikaitkan dengan sifat organofosfat yang merupakan inhibitor dari kolinesterase, yaitu salah satu neurotransmitter pada otak. Terhambatnya kolinesterase ini menyebabkan rangsangan saraf mengalir secara terus menerus dan mengakibatkan kejang hingga menyebabkan kematian (Yusnani, 2013).

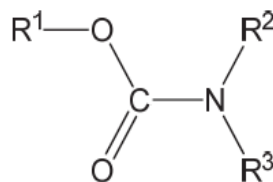
Namun tidak seperti organoklorin, insektisida jenis organofosfat ini mudah terurai di lingkungan oleh beberapa reaksi biologi dan senyawa kimia. Contoh dari insektisida jenis organofosfat yang sering digunakan yaitu parathion, malathion, dichlorphos, dimethoate, methamidophos, isocarbophos, dan trichlorphon.



**Gambar 2.3** struktur kimia pestisida golongan organofosfat (Kegley *et al.*, 2008).

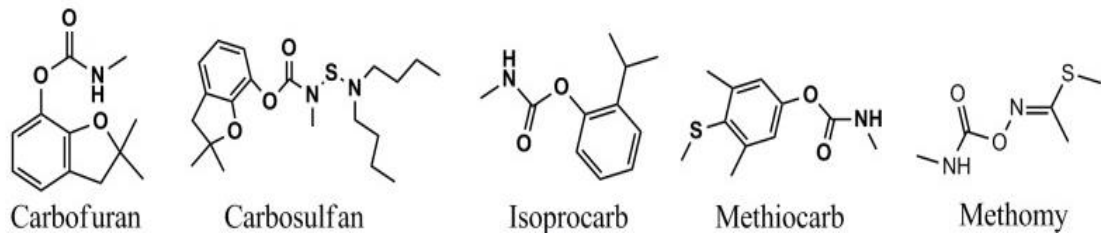
#### c. Karbamat

Karbamat adalah pestisida organik yang merupakan turunan dari senyawa asam karbamat. Struktur kimia dari karbamat dapat dijelaskan dengan R<sup>1</sup> sebagai gugus alkohol, R<sup>2</sup> adalah gugus metil dan R<sup>3</sup> adalah gugus hidrogen



**Gambar 2.4** Stuktur kimia karbamat (Kegley *et al.*, 2008).

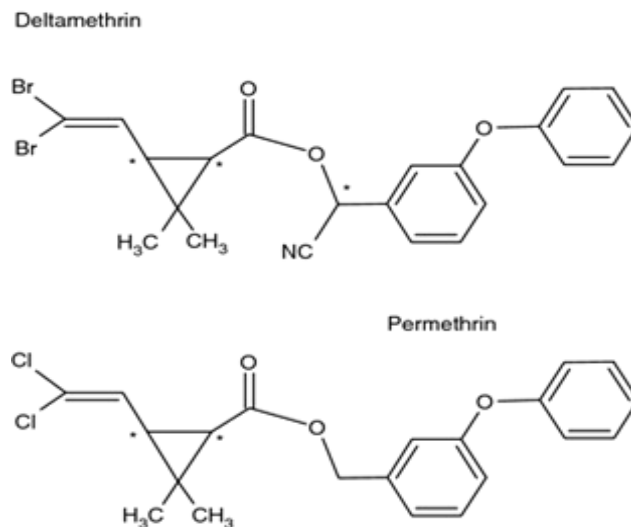
Karbamat memiliki dampak fisiologis yaitu menghambat aktivitas enzim asetilkolinesterase dengan gejala yang ditimbulkan sama seperti senyawa organofosfat. Contoh dari insektisida jenis organofosfat yang sering digunakan yaitu carbofuran, carbosulfan, isoprocab, methiocarb, dan methomy (Yaser dan Talal, 2011).



**Gambar 2.5** Struktur kimia pestisida golongan karbamat (Kegley *et al.*, 2008).

#### d. Piretroid

Piretroid merupakan senyawa kimia yang menyerupai struktur dari piretrin. Piretroid memiliki beberapa keunggulan, diantaranya diaplikasikan dengan takaran relatif sedikit, spektrum pengendaliannya luas, tidak persisten, dan memiliki efek melumpuhkan yang sangat baik. Namun karena sifatnya yang kurang atau tidak selektif, banyak piretroid yang tidak cocok untuk program pengendalian hama terpadu (Zulkarnain, 2010). Beberapa contoh dari pestisida jenis piretroid adalah permethrin dan deltamethrin.



**Gambar 2.6** Struktur kimia pestisida golongan piretroid (Kegley *et al.*, 2008).

### 2.1.3 Toksikologi Penggunaan Pestisida secara Berlebihan

Toksistas atau daya racun pestisida adalah sifat yang menggambarkan potensi pestisida untuk dapat menimbulkan kematian atau bahaya lainnya baik pada hewan (hama) maupun manusia. Toksistas pada pestisida dibedakan menjadi toksistas akut, kronik dan sub-kronik. Toksistas akut merupakan dampak mematikan yang dapat ditimbulkan setelah terpapar pestisida dengan dosis tunggal atau ganda dalam waktu kurang dari 24 jam. Toksistas akut dapat dinyatakan dalam angka LD<sub>50</sub> atau *lethal dose* 50% yaitu dosis dari

sebuah substansi kimia yang bersifat racun yang dapat mematikan 50% hewan uji dan dihitung dalam satuan mg/kg berat badan (Djojsumarto, 2008). Toksisitas sub-akut adalah dampak merugikan yang dapat ditimbulkan setelah terpapar pestisida selama 10% dari rentang hidupnya atau pada hewan coba yaitu pemaparan selama 3 bulan. Sedangkan toksisitas kronis adalah bahaya kesehatan yang ditimbulkan setelah terpapar pestisida dalam jangka waktu yang lama yaitu biasanya lebih dari 50% rentang hidup atau pada hewan coba periode pemaparan dapat dilakukan hingga 2 tahun. Menurut WHO (2011), berikut merupakan tabel klasifikasi tingkat bahaya pestisida.

**Tabel 2.1** Klasifikasi Tingkat Bahaya Pestisida

Kelas	LD <sub>50</sub> untuk Tikus (mg/kg berat badan)			
	Oral		Dermal	
	Padat	Cair	Padat	Cair
IA Sangat Berbahaya	<50	<20	<10	<10
IB Berbahaya	5-50	20-200	10-100	40-400
II Cukup Berbahaya	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III Agak Berbahaya	>500	>2000	>1000	>4000

Sumber: WHO, 2011

Pestisida golongan organofosfat memiliki aktivitas antikolinesterase seperti eter asam fosfat dan ester tiofosfat. Jenis pestisida tersebut memiliki mekanisme kerja yaitu menghambat penyaluran impuls saraf dengan cara mengikat kolinesterase, sehingga tidak terjadi hidrolisis asetilkolin. Hambatan oleh turunan karbamat hanya bekerja selama beberapa jam dan bersifat reversibel. Sedangkan hambatan oleh turunan ester asam fosfat bersifat irreversibel sehingga dapat merusak kolinesterase dan perbaikan baru terjadi setelah tubuh mensintesis kembali kolinesterase.

Organofosfat dapat digolongkan menjadi pestisida yang sangat berbahaya karena ikatan yang terjadi antara pestisida organofosfat dengan kolinesterase hampir bersifat irreversibel. Penurunan aktivitas kolinesterase akan menyebabkan timbulnya gejala yang tidak spesifik seperti pusing, mual, lemah, sakit pada bagian dada dan lain-lain.

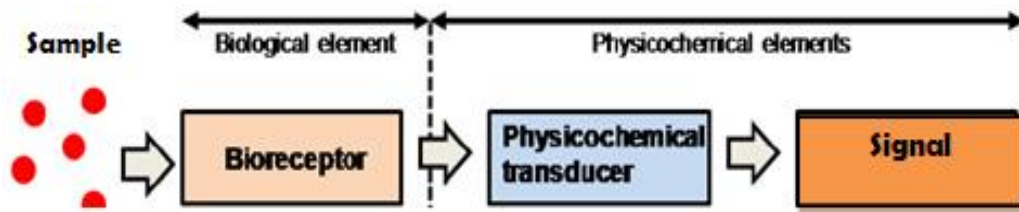
Salah satu dampak klinis dari keracunan akut dapat mengakibatkan sindrom sistem saraf pusat yang terjadi akibat masuknya pestisida ke otak melalui darah. Dampak yang ditimbulkan oleh sindrom sistem saraf pusat adalah kondisi medis konvulsi (kejang) yang terjadi saat otot tubuh mengalami peningkatan kontraksi dan peregangan secara cepat sehingga menyebabkan gerakan yang tidak terkendali.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rustia *et al.* (2010), menyebutkan bahwa dari hasil uji kolinesterase dalam darah yang dilakukan pada beberapa kelompok petani terjadi penurunan aktivitas kolinesterase hingga di bawah 75% merupakan *biological marker* (biomarker) keracunan senyawa golongan organofosfat dengan toksisitas keracunan ringan hingga sedang.

## **2.2 Biosensor**

### **2.2.1 Pengertian**

Biosensor dapat didefinisikan menjadi suatu instrumen analitik yang dapat melakukan deteksi atau pengenalan terhadap suatu zat biokimia tertentu dengan memanfaatkan biomolekul seperti enzim, antibodi, jaringan sel dan mikroorganisme (Souza *et al.*, 2014). Aplikasi dari biosensor ini dapat mendeteksi komponen kimia, antigen, mikroorganisme, hormon, asam nukleat, toksin, virus dan parameter subyektif seperti bau dan rasa (D'Souza, 2001). Biosensor memiliki dua komponen utama yaitu bioreseptor dan transduser. Bioreseptor merupakan biomolekul yang dapat mengenali target analit secara spesifik. Sedangkan transduser adalah komponen yang merubah sinyal biokimia yang dihasilkan dari reaksi antara bioreseptor dan target analit sehingga menjadi sinyal yang dapat dibaca (Sadana, 2003). Adanya reaksi antara bioreseptor dengan target analit yang ingin dideteksi menghasilkan perubahan fisikokimia pada lapisan atas biosensor. Perubahan fisikokimia pada biosensor tersebut dapat berupa perubahan warna, elektronegatif, dan afinitas selanjutnya akan diterjemahkan oleh transduser menjadi output berupa sinyal. Sinyal ini kemudian akan diperkuat dan diproses sehingga dapat dihasilkan sinyal terukur yang sebanding dengan konsentrasi target analit yang terdeteksi (Bidmanova, 2007). Beberapa negara telah mengembangkan biosensor secara komersial dalam bidang bioproses, kontrol kualitas makanan, kontrol kualitas lingkungan, serta militer. Biosensor komersial pertama dibuat oleh perusahaan Jepang yaitu Nisshin Electric yang memanfaatkan sel mikroorganisme untuk menghitung nilai BOD (*Biological Oxygen Demand*) pada tahun 1983 (Bidmanova, 2007).



Gambar 2.7 Skema Biosensor (Bidmanova, 2007).

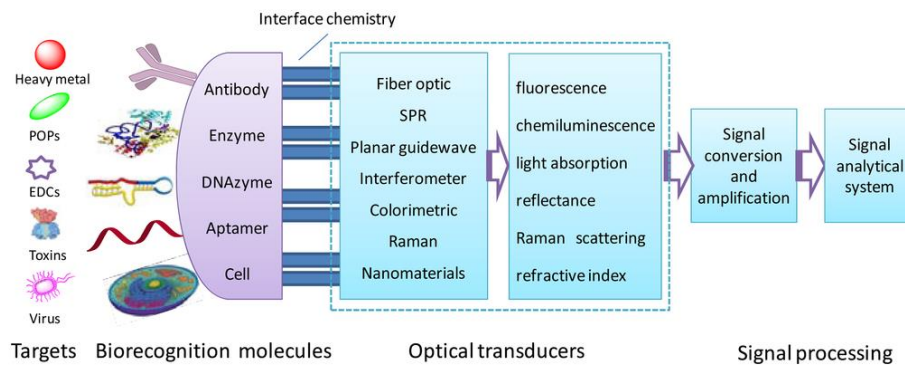
### 2.2.2 Klasifikasi Biosensor Berdasarkan Transduser

Secara umum biosensor dapat diklasifikasikan berdasarkan jenis transduser menjadi 4 yaitu kolorimetri, elektrokimia, optik, dan akustik. Biosensor berbasis kolorimetri merupakan biosensor yang menerapkan perubahan warna ketika terdapat reaksi antara reseptor dengan target analit. Biosensor elektrokimia merupakan biosensor yang menggunakan elektroda sebagai transduser sehingga ketika terdapat perubahan muatan listrik antara reseptor dan target analit. Biosensor optik merupakan biosensor yang memanfaatkan modifikasi sifat optik seperti UV-vis, reflektansi, dan fluoresensi yang terjadi akibat reaksi antara reseptor dan target analit. Sedangkan biosensor akustik didasarkan pada pengukuran perubahan sifat gelombang akustik yang beresonansi pada frekuensi antara 9 sampai 14 MHz (Morgan *et al.*, 1996 dalam Bidmanova, 2007). Diantara keempat jenis biosensor tersebut, biosensor berbasis kolorimetri lebih sering digunakan karena memiliki beberapa keunggulan diantaranya yaitu aplikasi mudah, reaksi cepat dan biaya relatif lebih rendah.

### 2.2.3 Klasifikasi Biosensor Berdasarkan Reseptor

Biosensor juga dapat diklasifikasikan berdasarkan reseptor atau komponen yang dapat mendeteksi target analit. Reseptor tersebut diantaranya yaitu enzim, antibodi, DNA, reseptor, organel dan mikroorganisme serta sel-sel hewan dan tumbuhan atau jaringan. Dengan demikian, biosensor dapat diklasifikasikan menjadi dua tipe yaitu biosensor katalis (*catalytic biosensor*) dan afinitas (*affinity biosensor*). Biosensor katalis adalah biosensor yang berbasis biokatalisator seperti enzim dan sel mikroorganisme yang dapat mendeteksi, mengikat, dan merubah secara kimia target analit yang ingin dideteksi. Sedangkan biosensor afinitas adalah biosensor berdasarkan molekul reseptor seperti antibodi, asam nukleat, hormon yang mengikat target secara irreversibel (Sadana, 2003).





**Gambar 2.8** Klasifikasi Biosensor (Bidmanova, 2007).

Diantara beberapa jenis reseptor tersebut, enzim merupakan reseptor yang sering digunakan pada pembuatan biosensor. Menurut D'Souza (2001), menjelaskan bahwa biosensor enzimatik adalah biosensor yang memanfaatkan molekul enzim dalam bentuk amobil yang dapat mendeteksi keberadaan target analit menjadi sinyal terukur dengan transduser yang sesuai. Enzim dengan kemurnian yang tinggi merupakan jenis enzim yang terbaik dalam penggunaan biosensor. Hal ini dikarenakan semakin tinggi kemurnian enzim maka target yang terdeteksi semakin spesifik sehingga hal tersebut menjadi keunggulan dari penggunaan enzim sebagai reseptor pada biosensor. Pada umumnya, dalam pembuatan biosensor enzim atau reseptor lain diaplikasikan dengan menggunakan teknik imobilisasi. Tujuan dari imobilisasi ini adalah untuk meningkatkan stabilitas enzim, mempertahankan aktivitas enzim, mengurangi jumlah enzim yang digunakan, serta mengendalikan waktu terjadinya reaksi atau deteksi target oleh bioreseptor (Mulchandani *et al.*, 2001). Berikut merupakan beberapa jenis enzim yang digunakan untuk mendeteksi pestisida.

**Tabel 2.2.** Enzim Pendeteksi Pestisida

Enzim	Target Analit
Asetilkolinesterase (EC 3.1.1.7)	Pestisida Golongan Karbamat dan Organofosfat (dichlorovos, parathion)
Butirilkolinesterase (EC 3.1.1.8)	Pestisida Golongan Organofosfat
Organofosfat hidrolase (EC 3.1.8.1)	Pestisida Golongan Organofosfat
Tyrosinase (EC 1.14.18.1)	Pestisida Golongan Karbamat dan Atrazine

Sumber: Bidmanova, 2007; Sassolas *et al.*, 2012

#### 2.2.4 Parameter Kualitas Biosensor

Parameter pada pembuatan biosensor didefinisikan sebagai nilai atau kondisi yang dijadikan tolak ukur kualitas biosensor yang dihasilkan. Tujuan pengukuran parameter kualitas biosensor adalah untuk mengetahui tingkat keberhasilan atau dapat dikatakan sebagai metode validasi deteksi target oleh biosensor. Menurut Justino *et al.* (2010), menjelaskan bahwa parameter kualitas biosensor yang sering digunakan adalah selektivitas, sensitivitas, limit deteksi, waktu respon, stabilitas, dan umur simpan.

Selektivitas didefinisikan menjadi kemampuan biosensor dalam mendeteksi target secara spesifik. Uji selektivitas dapat dilakukan dengan cara mereaksikan biosensor dengan komponen lain yang memiliki struktur kimia hampir sama dengan target analit. Biosensor dikatakan selektif apabila biosensor tersebut tidak bisa mendeteksi komponen selain target yang diinginkan. Sensitivitas adalah respon biosensor yang dihasilkan dengan adanya perubahan konsentrasi target analit. Biosensor dinyatakan sensitif apabila biosensor tersebut dapat merespon perubahan konsentrasi target meskipun dalam konsentrasi rendah. Batas deteksi (*detection limit*) merupakan konsentrasi target analit terendah yang dapat dideteksi oleh biosensor. Waktu respon adalah waktu yang dibutuhkan oleh biosensor dalam mendeteksi target analit. Biosensor dikatakan efektif apabila memiliki waktu respon yang cepat. Stabilitas didefinisikan menjadi kualitas biosensor yang dapat dipertahankan yang dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti suhu dan pH. Sedangkan waktu simpan biosensor adalah rentang waktu dimana biosensor masih dapat digunakan tanpa mengalami penurunan kualitas yang signifikan (Justino *et al.*, 2010).

#### 2.2.5 Biosensor Pendeteksi Pestisida

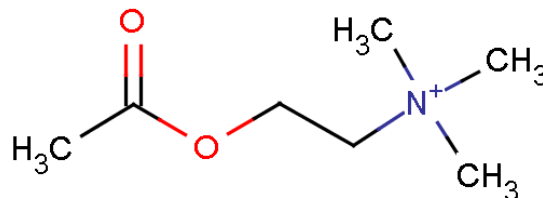
Salah satu aplikasi dari biosensor di bidang agrikultural adalah untuk mengendalikan serta mendeteksi residu pestisida pada sayuran. Hal ini dikarenakan apabila dibandingkan dengan teknik analisa menggunakan GC-MS, *spray mass spectroscopy* dan HPLC, biosensor memiliki beberapa keunggulan diantaranya yaitu aplikasi mudah, cepat, spesifik, dan bersifat *portable*. Berikut merupakan tabel mengenai penelitian terdahulu biosensor pendeteksi pestisida.

**Tabel 2.3.** Biosensor Pendeteksi Pestisida

Jenis Biosensor	Jenis Reseptor	Teknik Imobilisasi	Pestisida yang Dideteksi	Sumber
Amperometrik	Antibodi Anti-carbofuran	Penjebakan ( <i>Entrapment</i> )	Karbofuran	Sun <i>et al.</i> , 2011
Kolorimetri	Enzim Asetilkolin-esterase	Adsorpsi	Organofosfat, Karbamat	Guo <i>et al.</i> , 2013
Kolorimetri	Enzim Asetilkolin-esterase	Ikatan Silang ( <i>Crosslinking</i> )	Organofosfat, Karbamat	Badawy <i>et al.</i> , 2014
Konduktometri	Enzim Organofosfat Hidrolase	Ikatan Silang ( <i>Crosslinking</i> )	Organofosfat	Azizah <i>et al.</i> , 2014

### 2.3 Asetilkolin (ACh)

Asetilkolin adalah suatu neurotransmitter atau zat kimia penghantar rangsangan yang terdapat pada sistem saraf organisme vertebrata. Fungsi asetilkolin di sistem saraf salah satunya yaitu sebagai pengendali sistem otot manusia ketika mendapatkan rangsangan dari luar, asetilkolin berguna untuk meneruskan sinyal tersebut ke otak (Whittaker, 1990). Senyawa organik dengan rumus molekul  $\text{CH}_3\text{COOHCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  ini tersebar di seluruh tubuh manusia, terutama banyak terdapat di sistem saraf tepi (otonom) dan senyawa ini dikeluarkan dengan adanya stimulasi saraf. Setelah dikeluarkan, asetilkolin akan berdifusi di antara celah sinaps dan kemudian berikatan dengan reseptor asetilkolin pada membran post-sinaptik. Ikatan yang terjadi antara asetilkolin dengan reseptor ini bertujuan untuk menyampaikan sinyal dari saraf. Untuk mengakhiri transmisi sinyal asetilkolin maka diperlukan enzim asetilkolinesterase (AChE) sehingga asetilkolin terdegradasi (Purves, 2008). Struktur kimia dari asetilkolin terdiri atas ester dari asam asetat dan kolin. Asetilkolin merupakan substrat dari enzim asetilkolinesterase dengan ikatan yang terjadi yaitu pada sisi aktif ester asetilkolinesterase. Berikut merupakan gambar struktur kimia dari asetilkolin.



**Gambar 2.9** Struktur kimia asetilkolin (ACh) (Kegley *et al.*, 2008).

## **2.4 Asetilkolinesterase (AChE)**

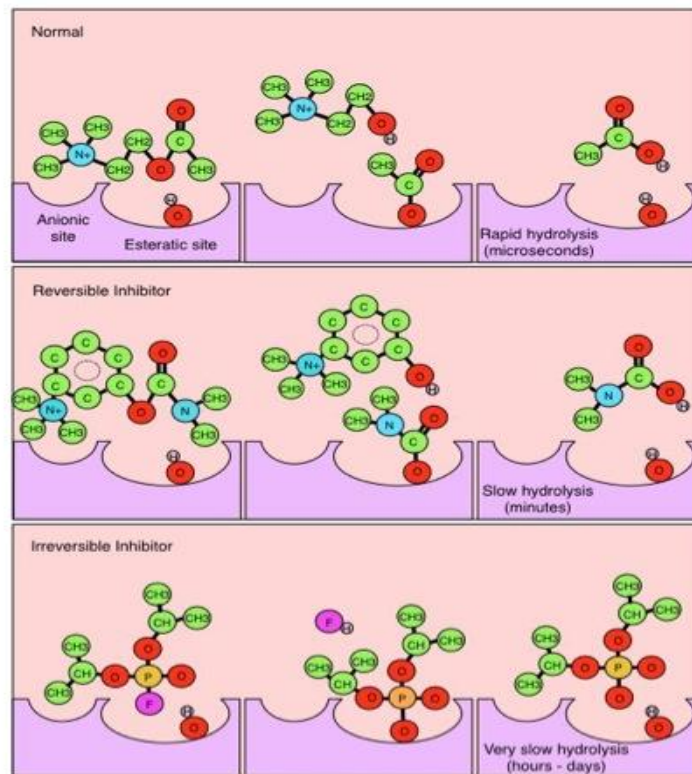
### **2.4.1 Definisi dan Struktur Enzim Asetilkolinesterase**

Asetilkolinesterase merupakan enzim yang bertanggung jawab terhadap metabolisme asetilkolin (ACh) pada sinaps setelah ACh dilepaskan oleh neuron presinaptik. Asetilkolinesterase akan menghidrolisis asetilkolin menjadi asetat dan kolin. Asetilkolinesterase terletak pada membran post-sinaptik, yang bertanggung jawab untuk mengakhiri transmisi sinyal oleh hidrolisis asetilkolin (Purves, 2008).

Asetilkolinesterase memiliki aktivitas katalitik yang tinggi, yaitu setiap satu molekul asetilkolinesterase akan mendegradasi 25.000 molekul asetilkolin tiap detik. Asetilkolinesterase memiliki dua sisi aktif yaitu sisi anion dan sisi ester. Pada sisi anion akan terjadi interaksi dengan residu 14 asam amino aromatik seperti triptofan dan alanin. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Tougu (2001), triptofan akan berikatan dengan sisi anion asetilkolinesterase dan dapat mengurangi aktivitas enzim tersebut. Sedangkan sisi ester asetilkolinesterase merupakan tempat dimana asetilkolin dihidrolisis menjadi ester asam asetat dan kolin. Pada sisi ester ini terdapat *catalytic triad*, yaitu tiga residu asam amino yang memiliki fungsi sinergis berupa enzim serine, histidine dan glutamat.

### **2.4.2 Mekanisme Penghambatan Organofosfat pada AChE**

Mekanisme primer dari pestisida organofosfat adalah inhibisi asetilkolinesterase, enzim yang terdapat pada sistem saraf pusat dan perifer. Organofosfat menonaktifkan asetilkolinesterase dengan cara fosforilasi kelompok hidroksil serin yang berada pada sisi aktif asetilkolinesterase yang akan membentuk senyawa kolinesterase terfosforilasi. Enzim kolinesterase tidak dapat berfungsi lagi yang mengakibatkan kadar aktif dari enzim tersebut berkurang. Berkurangnya aktivitas enzim kolinesterase mengakibatkan menurunnya kemampuan menghidrolisis asetilkolin, sehingga asetilkolin lebih lama di reseptor, yang akan memperhebat dan memperpanjang efek rangsang saraf (Wiener, 2004 dalam Fiananda, 2014). Berikut merupakan gambar mekanisme organofosfat dalam menghambat asetilkolinesterase.



**Gambar 2.10** Mekanisme organofosfat dalam menghambat asetilkolinesterase (Wiener, 2004 *dalam* Fiananda, 2014).

## 2.5 Imobilisasi Enzim

### 2.5.1 Pengertian

Imobilisasi dalam bidang bioteknologi didefinisikan sebagai suatu cara yang digunakan untuk menempatkan secara fisika atau kimia suatu sel, organel, enzim atau protein lainnya ke dalam suatu penyangga berupa bahan padat, matrik, atau membran. Imobilisasi dilakukan dengan maksud untuk meningkatkan stabilitas dan membuat sel, organel atau enzim dapat digunakan secara terus menerus (Brodelius, 1987 *dalam* Betha, 2009).

Imobilisasi enzim merupakan suatu teknik dimana enzim ditempatkan dalam materi tertentu (penyangga) sehingga aktivitas katalitiknya dipertahankan. Tujuan dari imobilisasi enzim adalah enzim tersebut dapat dikendalikan atau diatur waktu terjadinya reaksi antara enzim dengan substrat (Tan *et al.*, 2006). Metode imobilisasi enzim dapat dibagi atas 3 kategori dasar, yaitu metode ikat silang (*cross-linking*), adsorpsi, serta penjebakan (*entrapment*).

### 2.5.2 Ikatan Silang (*cross-linking*)

Metode ini dilakukan dengan cara menggunakan sistem dimana materi biologis seperti enzim, sel, atau antibodi dapat terikat secara kovalen pada senyawa perantara yang menghubungkan sel dengan gugus reaktif suatu matriks. Salah satu reagen seperti glutaraldehid dapat digunakan sebagai bahan yang dapat membentuk ikatan silang dengan enzim (Emregul *et al.*, 2006). Imobilisasi dengan ikatan silang mudah dilakukan namun memiliki kelemahan diantaranya kerapuhan partikel, keterbatasan substrat (Costa *et al.*, 2005) dan sifat toksisitas reagen dapat membatasi teknik imobilisasi (Barredo, 2005).

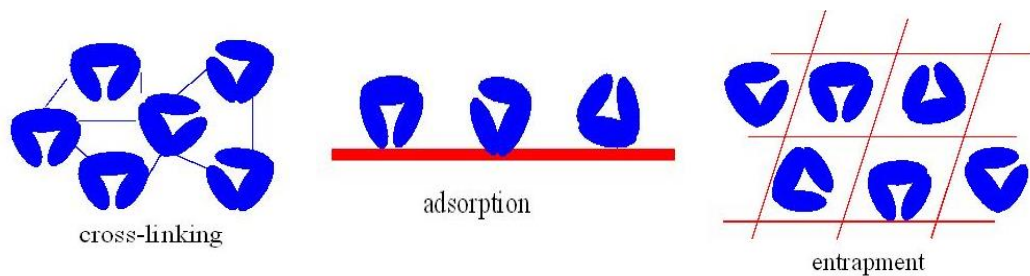
### 2.5.3 Adsorpsi

Imobilisasi enzim dengan adsorpsi didasarkan pada interaksi yang lemah antara matriks dengan enzim, seperti interaksi ionik, ikatan hidrogen dan van der Waals (Costa *et al.*, 2005). Jumlah enzim yang digunakan tergantung pada waktu inkubasi, pH, kekuatan ionik, area permukaan, porositas dan karakteristik enzim serta matriks (Mahmoud, 2007). Kekurangan dari metode adsorpsi adalah ikatan enzim ini relatif lemah sehingga menyebabkan enzim mudah tercuci dari matriks dan dinilai kurang efektif (Tan *et al.*, 2006).

### 2.5.4 Penjebakan (*entrapment*)

Metode ini adalah metoda yang paling banyak dikembangkan untuk imobilisasi sel. Metode ini dilakukan dengan membuat sel mikroorganisme terperangkap di dalam matriks polimer. Penjebakan (*entrapment*) merupakan salah satu teknik imobilisasi enzim dengan cara memperangkap enzim dalam matriks polimer yang berukuran mikro (Souza *et al.*, 2014). Sedangkan menurut Betha (2009), metode *entrapment* ini didasarkan pada terjadinya inklusi enzim di dalam suatu jaringan atau matriks yang bertujuan untuk mencegah sel berdifusi ke lingkungan atau medium disekitarnya, akan tetapi enzim tersebut masih dapat berinteraksi dengan substrat.

Matriks yang paling baik untuk digunakan pada imobilisasi enzim dengan metode *entrapment* adalah silika dengan teknik sol-gel. Kelebihan dari teknik sol-gel adalah cara kerja sederhana, gel yang digunakan bersifat tidak toksik, porositas besar untuk difusi enzim dan matriks, lebih stabil terhadap suhu tinggi, serta lama penyimpanan yang panjang (Vu dan Le, 2008).



**Gambar 2.11** Ilustrasi metode imobilisasi enzim (Vu dan Le, 2008).

## 2.6 Sol-Gel

### 2.6.1 Pengertian

Definisi sol-gel menurut Julie (2009), proses pembentukan senyawa anorganik dalam bentuk tiga dimensi yang berasal dari partikel suspensi koloid dengan diameter 1-10 nm. Sedangkan menurut Mulchandani *et al.* (2001), sol-gel merupakan proses dimana larutan mengalami perubahan fase menjadi sistem “sol” yaitu koloid (zat heterogen) yang tersuspensi dalam larutannya, kemudian menjadi sistem “gel” yaitu koloid dengan bentuk semisolid terpenetrasi ke dalam larutan. Sol-gel dapat diaplikasikan pada pembuatan biosensor karena memiliki beberapa keunggulan yaitu proses sederhana, porositas dapat dikendalikan, transparan, tidak bersifat toksik dan memiliki kestabilan yang tinggi (Bidmanova, 2007).

### 2.6.2 Sol-Gel sebagai Media *Entrapment* Enzim

Sol-gel merupakan salah satu media yang dapat digunakan untuk *entrapment* suatu molekul dengan mendapatkan sifat fisika dan kimia tertentu yang sesuai dengan lingkungan enzim. Menurut Wulan *et al.* (2007) media pengimobilisasi enzim yang sering digunakan adalah sol-gel berbasis silika. Sol-gel berbasis silika memiliki ruang pengunci (*interlocking cavasities*) yang memberikan media dengan luas permukaan besar sehingga memungkinkan enzim untuk terperangkap. Pada dasarnya, proses pembentukan sol-gel dengan menggunakan prekursor silika terdiri dari dua tahap. Tahap pertama yaitu preparasi prekursor silika melalui proses hidrolisis untuk membentuk suspensi sol dari nanopartikel silika dengan diameter 1-10 nm. Langkah berikutnya yaitu mencampurkan sol dengan buffer tertentu yang bertujuan meningkatkan kekuatan ionik sol sehingga terjadi proses kondensasi secara cepat. Hal tersebut mengakibatkan pembentukan gel yang dikarenakan adanya ikatan silang yang longgar pada matriks silika sehingga gel yang terbentuk memiliki karakteristik yaitu berpori dan terhidrasi yang memungkinkan suatu

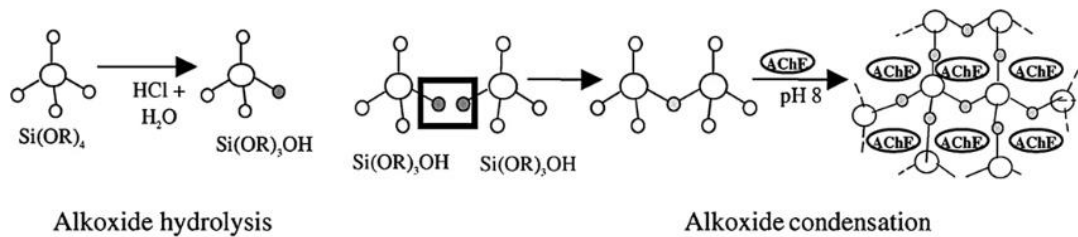
molekul seperti enzim dapat masuk ke dalam pori-pori matriks tersebut. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Luckham dan Brennan (2010), senyawa enzim yang diimobilisasi dengan teknik *entrapment* berbasis sol-gel memiliki stabilitas yang lebih lama. Bahan yang sering digunakan dalam imobilisasi enzim menggunakan teknik *entrapment* dan media sol-gel berbasis silika adalah tetraetilortosilikat (TEOS) (Wang *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2014; Ponamoreva *et al.*, 2015).

## 2.7 Tetraetilortosilikat (TEOS)

Tetraetilortosilikat (TEOS) adalah senyawa organik dengan rumus kimia  $(C_2H_5O)_4Si$ . TEOS merupakan salah satu polimer sintesis yang sering digunakan sebagai bahan baku (prekursor) pembuatan silika. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.* (2000), menyebutkan bahwa penggunaan TEOS sebagai prekursor silika dalam imobilisasi enzim tidak hanya mengikat enzim saja, tapi juga meningkatkan sifat thermal serta stabilitas enzim dalam fabrikasi biosensor.

Proses pembuatan sol-gel dengan prekursor TEOS adalah sebagai berikut. Prekursor jenis silika seperti TEOS tidak larut dalam air, sehingga pengemulsi alkohol (*emulsifying alcohol*) perlu ditambahkan untuk meningkatkan kelarutan TEOS (tetraetoksi ortosilika). Pada dasarnya, gugus -R pada silika merupakan gugus alkohol, sehingga untuk melarutkan TEOS biasanya ditambahkan etanol sedangkan pada TMOS (tetrametoksi orthosilika) menggunakan methanol. Proses hidrolisis dapat terjadi dengan katalisis baik menggunakan asam atau basa. Pada katalisis menggunakan asam didasarkan pada reaksi substitusi elektrofilik, sedangkan katalisis menggunakan basa didasarkan pada reaksi substitusi nukleofilik. Dalam reaksi tersebut, gugus alkohol akan terlepas dan akan terbentuk silanol atau prekursor yang terhidrolisis. Selanjutnya, akan terjadi reaksi polimerisasi atau kondensasi antara silanol satu dengan silanol lain sehingga terbentuk polimer siloxane (Si-O-Si). Polimer siloxane ini digunakan sebagai matriks yang dapat menjebak enzim sehingga dapat terimobilisasi (Oujji *et al.*, 2013).



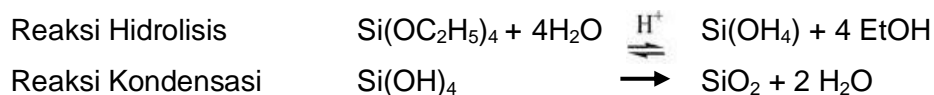


**Gambar 2.12** Prinsip pembentukan sol-gel (Oujji *et al.*, 2013)

## 2.8 Rasio Molar TEOS:H<sub>2</sub>O

Rasio Molar merupakan rasio atau perbandingan diantara dua atau lebih komponen yang terdapat dalam suatu reaksi kimia. Rasio molar biasanya digunakan untuk menyelesaikan persoalan stokiometri, hal ini dikarenakan rasio molar adalah faktor konversi yang dapat dikaitkan dengan jumlah mol yang terdapat pada suatu substansi dengan jumlah mol pada substansi lain yang terlibat dalam suatu reaksi kimia. Rasio molar juga dapat didefinisikan menjadi fraksi mol yang biasanya disimbolkan dalam % mol (Morrel, 2002).

Pada proses pembuatan sol-gel rasio molar TEOS dengan H<sub>2</sub>O merupakan faktor yang sangat krusial. Hal ini dikarenakan H<sub>2</sub>O merupakan elemen penting baik dalam reaksi hidrolisis dan kondensasi pembentukan TEOS. Menurut persamaan stokiometri, pada reaksi hidrolisis perbandingan rasio molar antara TEOS dengan H<sub>2</sub>O adalah 1:4. Hal ini dapat dikatakan bahwa setiap 1 mol TEOS membutuhkan 4 mol H<sub>2</sub>O agar TEOS dapat terhidrolisis sempurna menjadi silanol. Sedangkan pada reaksi kondensasi setiap 1 mol TEOS melepaskan 2 mol H<sub>2</sub>O sehingga dapat dikatakan pada kondensasi TEOS memiliki perbandingan rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O yaitu 1:2 (Sakka, 2005). Berikut merupakan reaksi pembentukan TEOS.



Studi mengenai pengaruh rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O telah banyak diteliti, seperti menurut Brinker dan Scherer (2003), ketika rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O yaitu 1:2 menghasilkan pembentukan rantai yang linear karena kurangnya H<sub>2</sub>O pada reaksi hidrolisis, sehingga dapat digunakan untuk aplikasi fabrikasi fiber (*fiber fabrication*). Sedangkan rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O 1:3 terjadi pembentukan silika dengan bentuk dua dimensi sehingga dapat diaplikasikan untuk pembentukan

fabrikasi lapisan tipis (*thin film fabrication*). Pada rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O lebih dari 1:4 terjadi pembentukan silika dengan bentuk tiga dimensi sehingga sesuai untuk aplikasi pembentukan monolit (*monolith fabrication*).

Akan tetapi, besarnya rasio H<sub>2</sub>O juga dapat menyebabkan keretakan (*cracking*) pada struktur sol-gel hal ini terkait dengan besarnya residu H<sub>2</sub>O yang tidak digunakan dalam proses pembentukan sol-gel dan mengakibatkan sistem sol-gel tidak stabil sehingga terjadi keretakan (Malhotra dan Turner, 2003). Pada aplikasi sol-gel untuk imobilisasi enzim keretakan tersebut sangat dihindari karena retaknya sol-gel akan menginisiasi proses *leaching* atau pecahnya sistem sol-gel, sehingga semua isi sol-gel termasuk enzim akan keluar dan imobilisasi enzim tersebut menjadi tidak efektif. Menurut Biro *et al.* (2016), imobilisasi enzim  $\beta$ -galaktosidase memiliki aktivitas katalik terbaik saat diimobilisasikan dalam sol-gel dengan rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O yaitu 1:7. Rasio molar tersebut juga dapat memperpanjang waktu simpan enzim  $\beta$ -galaktosidase hingga 20 hari dengan aktivitas enzim dapat dipertahankan hingga 80% pada penyimpanan suhu 25°C.

## **2.9 Pengaruh Jenis Katalis pada Sol-gel**

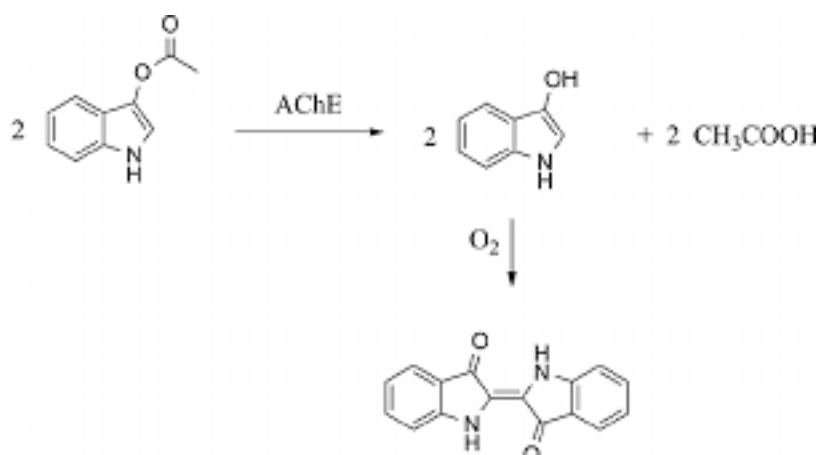
Pemilihan jenis katalis sangat penting karena berpengaruh terhadap struktur silika yang dihasilkan selama proses hidrolisis dan kondensasi TEOS. Menurut Milea *et al.* (2011), perubahan pH pada permukaan silika dengan menggunakan asam atau basa sebagai katalis dapat meningkatkan proses hidrolisis atau kondensasi. Jenis katalis asam cenderung meningkatkan proses kondensasi dan menghasilkan ukuran pori-pori sol-gel yang lebih kecil serta struktur yang kompak. Jenis asam yang sering digunakan untuk katalis sol-gel adalah HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Sedangkan jenis katalis basa seperti NaOH dan NH<sub>3</sub> cenderung mempercepat proses nukleasi pada hidrolisis TEOS yang menghasilkan pori-pori sol-gel lebih besar.

Pada imobilisasi enzim dengan menggunakan sol-gel jenis katalis sangat berpengaruh terhadap nilai pH sol-gel yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim yang diimobilisasi. pH sol-gel diusahakan berada pada *range* pH optimum enzim agar tidak mempengaruhi atau bahkan menurunkan aktivitas enzim tersebut. Menurut Verma (2011), sol-gel dengan jenis katalis NaOH dengan konsentrasi 5 mM sesuai untuk imobilisasi enzim dalam sol-gel yang diaplikasikan pada biosensor dengan teknik kolorimetri. Hal tersebut dikaitkan dengan pH sol-gel cenderung netral (pH=7) sehingga tidak menyebabkan denaturasi enzim dan aktivitas katalik enzim dapat dipertahankan. Sedangkan

menurut Anitha (2004), menyebutkan bahwa pH optimal enzim asetilkolinesterase adalah pH 7-8 sehingga seluruh komponen yang berpengaruh terhadap enzim seperti pH sol-gel dan buffer harus pada rentang pH tersebut.

## 2.10 Indoxyl Acetate

*Indoxyl acetate* merupakan suatu bahan kimia yang merupakan substrat kromogenik bagi enzim asetilkolinesterase. *Indoxyl acetate* merupakan senyawa yang memiliki *fluorescent* tinggi serta mudah ketika dioksidasi oleh udara yang menyebabkan warna *indoxyl acetate* akan berubah menjadi biru indigo. Menurut penelitian, reaksi yang terjadi antara enzim asetilkolinesterase dengan *indoxyl acetate* adalah sebagai berikut. Pada tahap pertama, *indoxyl acetate* dihidrolisis oleh enzim asetilkolinesterase menjadi *indoxyl* yang bersifat *fluorescent*. Kemudian, ketika terjadi kontak dengan udara maka terjadi oksidasi *indoxyl* sehingga berubah warna menjadi putih indigo yang memiliki sifat *fluorescent* dua kali lebih kuat daripada sebelumnya. Pada tahap terakhir, terjadi oksidasi lanjutan sehingga warna *indoxyl* berubah menjadi biru indigo yang bersifat *nonfluorescent* (Guilbault dan Kramer, 1965).



**Gambar 2.13** Reaksi Hidrolisis *Indoxyl Acetate* oleh Enzim Asetilkolinesterase

Aplikasi *indoxyl acetate* pada biosensor pendeteksi pestisida ini memiliki kelebihan diantaranya yaitu *indoxyl acetate* dapat menjadi substrat sekaligus kromofor pada enzim asetilkolinesterase. Sehingga ketika enzim asetilkolinesterase bereaksi dengan *indoxyl acetate* maka terjadi hidrolisis menghasilkan produk berwarna biru indigo. Warna biru ini mengindikasikan adanya reaksi antara enzim asetilkolinesterase dengan *indoxyl acetate*. Apabila dibandingkan dengan kromofor lain yaitu ditiobis nitrobenzoat (DTNB), enzim asetilkolinesterase tidak bisa bereaksi langsung dengan DTNB tersebut

melainkan harus berikatan terlebih dahulu dengan substrat berupa asetiltiokolin iodida (ATChI). Sehingga dapat dikatakan bahwa kromofor *indoxyl acetate* lebih efektif digunakan karena bisa berikatan langsung dengan enzim asetilkolinesterase dibandingkan dengan DTNB yang memerlukan komponen lain yaitu ATChI sebagai substrat (Guo *et al.*, 2013).

## **2.11 Kertas Whatman**

### **2.11.1 Definisi**

Kertas adalah salah satu biopolimer yang telah banyak diterapkan untuk aplikasi biosensor (Costa *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 20015; dan Guan *et al.*, 2015). Kelebihan kertas sebagai *platform* biosensor diantaranya adalah kertas memiliki sifat fisikokimia di mana permukaannya mudah dimodifikasi untuk imobilisasi protein, enzim, DNA dan molekul lain; *wettability* atau keterbasahan kertas dapat dikontrol untuk transportasi fluida; serta kertas terbuat dari serat selulosa yang merupakan biopolimer yang dengan jumlah berlimpah sehingga kertas merupakan bahan yang sesuai untuk pembuatan sensor analitik dalam skala besar karena jumlah nya yang banyak (Guan *et al.*, 2015).

Kertas Whatman merupakan kertas yang dibuat dari selulosa yang berkualitas dan sering dipakai untuk analisa laboratorium. Kertas Whatman memiliki struktur selulosa tipe kristalin dengan derajat kristalinitas sebesar 86%. Kelebihan dari selulosa kristalin ini adalah tidak mudah larut dalam air, kuat dan stabil (Hidayat, 2008 *dalam* Sakti, 2017). Kertas Whatman ini sendiri terbagi menjadi beberapa tipe sehingga penggunaannya juga harus disesuaikan dengan spesifikasi kertas dan tujuan penelitian. Beberapa penelitian menggunakan Kertas Whatman No. 1 untuk aplikasi biosensor dengan teknik kolorimetri. Hal ini dikarenakan kertas Whatman No. 1 memiliki spesifikasi yaitu memiliki struktur *porous* atau berpori besar sehingga dapat dijadikan media adsorpsi biomolekul seperti enzim yang baik, tidak bereaksi dengan biomolekul, serta kertas Whatman No. 1 memiliki nilai *tensile strength* yang tinggi sehingga dapat dikatakan memiliki daya kuat yang baik serta tidak mudah larut (Guan *et al.*, 2005). Berikut merupakan tabel tentang beberapa penelitian yang menggunakan kertas Whatman No.1 sebagai biosensor teknik kolorimetri.

**Tabel 2.4** Aplikasi Kertas Whatman No. 1 sebagai Biosensor

Jenis Reseptor	Teknik Imobilisasi	Aplikasi Biosensor		Sumber
Enzim <i>Urate oxidase</i>	<i>Cross linking</i> dengan kitosan	Deteksi Asam Urat		Yu <i>et al.</i> , 2011
Enzim Asetilkolinesterase	<i>Cross linking</i> dengan glutaraldehid	Deteksi Pestisida	Residu	Badawy <i>et al.</i> , 2014
Enzim <i>Glucose oxidase</i>	Entrapment dengan Sol gel	Deteksi Glukosa		Guan <i>et al.</i> , 2015
Enzim Asetilkolinesterase	Adsorpsi	Deteksi Pestisida	Residu	Sakti, 2017

## 2.12 Metode *Response Surface Methodology*

Dalam penelitian-penelitian yang berkaitan dengan optimasi proses, dewasa ini telah dikembangkan penggunaan suatu metode yang disebut *Response Surface Methodology* (RSM) yaitu suatu kumpulan teknik matematika dan statistika yang diaplikasikan untuk memodelkan dan menganalisa data dengan respon yang diteliti dipengaruhi oleh beberapa variabel. Tujuan dari penggunaan RSM ini adalah untuk menghasilkan respon yang optimal pada suatu rancangan percobaan (Montgomery, 2001). Penggunaan RSM untuk optimasi formulasi sol-gel telah dilakukan oleh Lu *et al.* (2009), melakukan penelitian mengenai optimasi sol-gel sebagai media imobilisasi enzim tripsin dengan menggunakan metode RSM. Dari hasil penelitian tersebut didapatkan bahwa aktivitas enzim tripsin yang terimobilisasi pada sol-gel sebesar 35,6% dan jumlah tripsin yang terimobilisasi sebesar 68,3%.

Langkah pertama dari metode permukaan respon adalah menentukan parameter mana yang dinyatakan sebagai variabel  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  dan seterusnya (Santosa, dkk. 2006). Langkah selanjutnya adalah menemukan hubungan antara respon  $y$  dengan variabel independen  $X_1$  melalui persamaan polinomial orde satu (model orde I). Dinotasikan variabel-variabel independen dengan  $X_1$ ,  $X_2$ , ...,  $X_k$ . Variabel-variabel tersebut diasumsikan terkontrol oleh peneliti dan mempengaruhi variabel respon  $y$  yang diasumsikan sebagai variabel random. Jika respon dimodelkan secara baik dengan fungsi linear dari variabel-variabel independen  $X_i$ , maka aproksimasi fungsi dari model orde I adalah:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon$$

dengan  $y$  : variabel dependen (respon yang diinginkan)

$X_i$  : faktor-faktor yang berpengaruh terhadap variabel respon,  $i = 1, 2, \dots, k$

$\beta_0$  : konstanta

$\beta_i$  : hasil linear

$\varepsilon$  : komponen residual (error)

Selanjutnya pada keadaan mendekati respon, model orde dua atau lebih biasanya disyaratkan untuk mengaproksimasi respon karena adanya lengkungan (*curvature*) dalam permukaannya. Dalam banyak kasus, model orde dua dinyatakan seperti dibawah ini:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} X_i X_j, i < j$$

dengan  $y$  : variabel dependen (respon yang diinginkan)

$X_i$  : faktor-faktor yang berpengaruh terhadap variabel respon,  $i = 1, 2, \dots, k$

$\beta_0$  : konstanta

$\beta_i$  : hasil linear

$\beta_{ii}$  : hasil kuadrat

$\beta_{ij}$  : hasil interaksi

Menurut Nurmiah *et al.* (2013), secara umum prosedur melakukan penelitian optimasi dengan menggunakan RSM adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan rancangan formulasi dan respon berdasarkan desain eksperimental yang dipilih.
2. Tahapan formulasi, yaitu melakukan proses penelitian sesuai dengan kondisi formula yang ditetapkan.
3. Melakukan analisis respon.
4. Melakukan optimasi dilanjutkan dengan verifikasi sebagai pembuktian terhadap prediksi nilai respon solusi formula optimum.

### III METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Januari hingga Agustus 2017.

#### 3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut: tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet ukur, bola hisap, pipet tetes, beaker 100 ml, labu takar 100 ml, penyemprot alkohol, botol semprot aquades, pinset, botol vial, spatula, gelas pengaduk, cawan petri, mikropipet Eppendorf® 10-100 µl dan 100-1,000 µl, mikropipet Pipetman® 2-20 µl, *magnetic stirer*, *microplate reader* Biotek Elx808™, mikrotip 1 ml, ultratip, kompor listrik, mikrotub 1,5 ml, pH meter, *freezer*, inkubator, autoklaf dan *scanner-printer* Epson TX121.

#### 3.3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah asetilkolinesterase (AChE) dari *Electrophorus electricus* tipe VI-S (C3389-500UN, aktivitas enzim 200-1000 unit/mg), tetraetilortosilikat (TEOS), kromofor *indoxyl acetate* yang dibeli dari Sigma-Aldrich®. Tris-base (121,14 g/mol), buffer fosfat p.a , H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> p.a.1M, HCl p.a 1M , aquades pH 7, aquabides, pestisida merek Callicron 500 EC (bahan aktif profenofos), sayur selada organik merek Kaliandra, selada yang diambil secara acak di Pasar Dinoyo, tisu, sarung tangan, *masker*, alkohol, *aluminium foil*, kapas, dan kertas label dibeli dari toko alat-alat laboratorium Kridatama dan Makmur, Malang.

#### 3.4 Metodologi Penelitian

Penelitian yang dilakukan menggunakan dua tahap penelitian. Penelitian tahap I merupakan penelitian yang bertujuan untuk memperoleh optimasi sol-gel berbasis silika menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) dengan faktor yang diteliti adalah rasio molar antara TEOS dengan H<sub>2</sub>O serta konsentrasi NaOH yang merupakan katalis sol-gel. Selanjutnya tahap II yaitu dilanjutkan dengan proses fabrikasi (pembuatan) biosensor dengan

menggunakan formulasi sol-gel berbasis silika yang optimal dari hasil penelitian I serta aplikasi biosensor terhadap sayur selada.

#### **3.4.1 Metode Penelitian Tahap I**

Pada penelitian tahap I ini dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh hasil optimasi sol-gel sebagai media imobilisasi enzim. Penelitian tahap I ini dibagi menjadi beberapa tahap diantaranya yaitu formulasi sol-gel berdasarkan *software Response Surface Methodology* (RSM). Selanjutnya, setelah didapatkan rancangan percobaan maka dilakukan penentuan respon yang diteliti yaitu jumlah enzim terimobilisasi (%) dan aktivitas enzim terimobilisasi (%) pada setiap formulasi sol-gel. Selanjutnya, dilakukan pemilihan model yang sesuai dengan penelitian ini. Setelah didapatkan model yang terbaik, dilakukan analisa data dengan menggunakan ANOVA untuk mengetahui adanya interaksi antar faktor yaitu rasio molar TEOS dengan H<sub>2</sub>O dan konsentrasi NaOH (mM). Setelah didapatkan model yang sesuai, maka dilakukan penentuan kondisi optimum atau sering disebut dengan tahap optimasi. Tahap terakhir penelitian I yaitu, dilakukan verifikasi untuk membuktikan hasil prediksi dan nilai respon solusi formula optimum yang disarankan oleh program *Design Expert*.

##### **a. Formulasi Sol-gel dengan *Software Response Surface Methodology* (RSM)**

Metode *Response surface methodology* (RSM) merupakan metode statistik yang digunakan dengan tujuan pengoptimalan hasil atau respon yang diteliti. Pada penelitian ini, jenis RSM yang dipilih adalah *central composite design* (CCD) dikarenakan metode ini paling tepat untuk membangun model polinomial dari 2 variabel bebas (faktor) terhadap respon (hasil) yang diteliti. Dalam pembuatan sol-gel dilakukan optimasi dengan metode *Response Surface Methodology* (RSM) menggunakan bantuan piranti lunak *Design Expert 7.0*. Tahapan awal yang harus dilakukan yaitu merancang variabel eksperimental yang diinginkan. Faktor yang digunakan dalam optimasi yaitu pertimbangan rasio molar antara TEOS dan H<sub>2</sub>O. Faktor lain yang dilakukan optimasi yaitu konsentrasi NaOH (mM). Sedangkan respon yang diteliti yaitu jumlah serta aktivitas relatif enzim terimobilisasi.

Pada rancangan percobaan ini, proporsi relatif sol-gel ini mengacu pada literatur yaitu Kaur *et al.* (2014), dengan formulasi sol-gel sebagai berikut 50 µl TEOS, 60 µl H<sub>2</sub>O deionisasi, ethanol 570 µl dan NaOH yang ditambahkan yaitu 5 mM sebanyak 10 µl. Akan tetapi, ketika penelitian dilakukan variasi pada



perbandingan rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O dan konsentrasi NaOH yang sesuai untuk imobilisasi enzim asetilkolinesterase.

Berdasarkan penelitian pendahuluan, didapatkan rasio molar terbaik TEOS:H<sub>2</sub>O yaitu 1:8 sedangkan konsentrasi NaOH terbaik yaitu 4 mM. Data terbaik pada penelitian pendahuluan tersebut dimasukkan pada rancangan *Response Surface Methodology* (RSM) sebagai data pusat (0). Sedangkan data unit minimum (-1) merupakan batas bawah dan unit maksimum (1) merupakan dari batas atas. Pada penelitian ini, faktor pertama yaitu rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O, data unit minimum yang dimasukkan adalah 1:4, data pusat yaitu 1:8, sedangkan unit maksimum adalah 1:12. Faktor kedua yaitu konsentrasi NaOH dengan data sebagai berikut unit minimum yang dimasukkan adalah 3 mM, data pusat 4 mM, sedangkan untuk unit maksimum adalah 5 mM. Setelah dimasukkan data tersebut, maka didapatkan nilai kode dan non kode seperti pada **tabel 3.1** sebagai berikut.

**Tabel 3.1** Nilai Kode dan Non-kode Rancangan Percobaan Metode RSM

Faktor	Kode	- $\alpha$	-1	0	1	$\alpha$
Rasio Molar (H <sub>2</sub> O:TEOS)	X <sub>1</sub>	2,344	1:4	1:8	1:12	1:13,66
Konsentrasi NaOH (mM)	X <sub>2</sub>	2,59	3	4	5	5,41

Pada **Tabel 3.2** menjelaskan tentang hasil rancangan percobaan dari *Response Surface Methodology* (RSM) dengan model *Central Composite Design* (CCD). Berdasarkan hasil tersebut didapatkan formulasi sol-gel sebanyak 13 macam rancangan dan 5 rancangan diantaranya merupakan data pusat (*center*) sol-gel.

**Tabel 3.2** Hasil Rancangan Percobaan Metode RSM

Std.	Run	Kode		Aktual	
		Faktor 1 Rasio Molar (H <sub>2</sub> O:TEOS)	Faktor 2 Konsentrasi NaOH (mM)	Faktor 1 Rasio Molar (H <sub>2</sub> O:TEOS)	Faktor 2 Konsentrasi NaOH (mM)
1	3	-1	-1	1:4	3
2	6	1	-1	1:12	3
3	9	-1	1	1:4	5
4	13	1	1	1:12	5
5	11	-1,414	0	1:2,34	4
6	2	1,414	0	1:13,66	4
7	4	0	-1,414	1:8	2,59
8	1	0	1,414	1:8	5,41
9	5	0	0	1:8	4
10	12	0	0	1:8	4
11	10	0	0	1:8	4
12	8	0	0	1:8	4
13	7	0	0	1:8	4

Pada **Tabel 3.2** faktor pertama yang diteliti merupakan rasio molar TEOS dengan H<sub>2</sub>O. Karena masih dalam bentuk rasio molar maka perlu dilakukan perhitungan untuk mengetahui volume TEOS dan H<sub>2</sub>O yang digunakan untuk masing-masing rasio molar seperti pada **Tabel 3.3**.

**Tabel 3.3** Data Volume TEOS dan H<sub>2</sub>O Pada Setiap Rancangan RSM

Std.	Rasio Molar		Volume yang Digunakan	
	TEOS	H <sub>2</sub> O	Volume TEOS ( $\mu$ l)	Volume H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)
1	1	4	83,15	26,85
2	1	12	55,87	54,13
3	1	4	83,15	26,85
4	1	12	55,87	54,13
5	1	2,34	17,48	92,52
6	1	13,66	52,31	57,69
7	1	8	66,83	43,16
8	1	8	66,83	43,16
9	1	8	66,83	43,16
10	1	8	66,83	43,16
11	1	8	66,83	43,16
12	1	8	66,83	43,16
13	1	8	66,83	43,16

### b. Penentuan Respon

Untuk mengetahui respon (hasil) yang dihasilkan pada masing-masing rancangan dilakukan uji respon yaitu analisa jumlah enzim terimobilisasi (%) serta aktivitas enzim terimobilisasi (%). Kedua respon tersebut dipilih karena menurut Shelden dan Pelt (2013), cara yang digunakan untuk menentukan efektivitas imobilisasi enzim adalah dengan menghitung jumlah enzim

terimobilisasi (%) serta aktivitas enzim terimobilisasi (%). Semakin tinggi jumlah dan aktivitas enzim yang terimobilisasi maka semakin efektif sol-gel tersebut untuk dijadikan media imobilisasi enzim.

1. Penentuan Respon Jumlah Enzim Terimobilisasi (Modifikasi Lu *et al.*, 2009).

Jumlah enzim terimobilisasi didefinisikan sebagai jumlah enzim yang terimobilisasi dalam media tertentu. Secara umum, menurut Lu *et al.* (2009), dalam analisa jumlah enzim terimobilisasi dilakukan dengan cara mengurangi jumlah enzim bebas (enzim yang tidak diimobilisasi) dengan enzim yang lisis (enzim yang tidak terimobilisasi oleh sol-gel) kemudian dibandingkan enzim bebas.

Pada penelitian ini cara yang dilakukan untuk mengukur enzim bebas ( $\Delta A_0$ ) adalah sebagai berikut. Pada sumuran mikropate dimasukkan buffer Tris-HCl pH 7,5 sebanyak 190  $\mu$ l, enzim asetilkolinesterase sebanyak 5  $\mu$ l dan ditambahkan *indoxyl acetate* 5 mg/ml sebanyak 5  $\mu$ l. Setelah itu, dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 630 nm. Pembacaan absorbansi tersebut dilakukan selama 20 menit setiap 2 menit sekali. Hal ini dilakukan untuk mengetahui perubahan absorbansi dalam rentang waktu 20 menit dan diharapkan substrat *indoxyl acetate* dapat dihidrolisis oleh enzim asetilkolinesterase sehingga menghasilkan perubahan warna larutan buffer menjadi warna biru.

Sedangkan untuk menghitung jumlah enzim lisis ( $\Delta A_1$ ) setelah proses imobilisasi dilakukan dengan cara sebagai berikut. Enzim asetilkolinesterase terlebih dahulu diimobilisasi pada masing-masing sol-gel yang ada pada rancangan RSM. Tahap imobilisasi adalah enzim asetilkolinesterase diambil sebanyak 5  $\mu$ l kemudian dicampurkan dengan masing-masing formulasi sol-gel dengan volume 5  $\mu$ l. Setelah dilakukan pencampuran dengan teknik pipetting maka campuran enzim dan sol-gel diteteskan pada kertas Whatman No. 1 ukuran 0,8 cm X 3 cm. Setelah itu, kertas Whatman dikering-anginkan selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah kering, kertas direndam dengan menggunakan buffer Tris-HCl pH 7,5 sebanyak 250  $\mu$ l dan diinkubasi pada selama 20 menit pada suhu ruang. Hasil rendaman buffer Tris-HCl tersebut diasumsikan sebagai enzim lisis atau enzim yang lisis atau tidak terimobilisasi oleh sol-gel (*unimmobilized enzyme*) yang disimbolkan dengan  $\Delta A_1$ . Setelah itu, hasil

rendaman buffer Tris-HCl dipipetting dan diambil sebanyak 195 µl dan ditempatkan pada mikroplate. Selanjutnya ditambahkan *indoxyl acetate* 5 mg/ml sebanyak 5 µl secara cepat. Selanjutnya, dilakukan pengukuran absorbansi sol-gel dengan menggunakan mikroplate reader setiap 2 menit pada panjang gelombang 630 nm selama 20 menit.

Untuk menghitung jumlah enzim lisis maka dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Jumlah Enzim Terimobilisasi (\%)} = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_1}{\Delta A_0} \times 100\%$$

$\Delta A_0$  merupakan absorbansi enzim bebas, sedangkan  $\Delta A_1$  merupakan absorbansi enzim yang lisis dalam buffer rendaman.

## 2. Penentuan Respon Aktivitas Enzim Terimobilisasi (Modifikasi Lu *et al.*, 2009).

Penentuan aktivitas enzim terimobilisasi dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim setelah proses imobilisasi. Menurut Lu *et al.* (2009), secara umum aktivitas enzim terimobilisasi didapatkan dari hasil pengurangan enzim bebas dengan enzim yang lisis kemudian dibandingkan dengan enzim bebas tersebut.

Untuk mengukur aktivitas enzim bebas dilakukan sebagai berikut. Pada sumuran mikroplate dimasukkan buffer Tris-HCl pH 7,5 sebanyak 190 µl, enzim asetilkolinesterase sebanyak 5 µl dan ditambahkan *indoxyl acetate* 5 mg/ml sebanyak 5 µl. Setelah itu, dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 630 nm. Pembacaan absorbansi tersebut dilakukan selama 20 menit setiap 2 menit sekali.

Setelah didapatkan absorbansi enzim bebas, kemudian dilakukan perhitungan untuk menghitung laju awal reaksi ( $V_0$ ). Laju awal reaksi ( $V_0$ ) merupakan perubahan absorbansi per satuan waktu, dalam hal ini yaitu  $A_{630}$ /menit. Laju awal dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$V_0 \text{ enzim bebas} = \frac{A_0 - A_{20}}{t_0 - t_{20}}$$

Keterangan pada rumus tersebut adalah  $A_0$  merupakan absorbansi enzim bebas menit ke-0,  $A_{20}$  merupakan absorbansi enzim bebas pada menit ke-20,  $t_0$  merupakan waktu menit ke-0, dan  $t_{20}$  merupakan waktu yang dibutuhkan sampai pengukuran absorbansi terakhir yaitu 20 menit.

Selanjutnya, dilakukan perhitungan aktivitas enzim bebas ( $V_b$ ) dengan menghitung konsentrasi produk yang dihasilkan per satuan waktu dengan rumus yang menggunakan prinsip Hukum Lambert-Beer sebagai berikut.

$$V_{\text{bebas}} (\text{mM/menit}) = \frac{V_0 \text{ enzim bebas} \times \text{Volume larutan}}{\epsilon l}$$

Pada rumus tersebut,  $V_0$  enzim bebas merupakan laju awal reaksi enzim bebas dalam satuan  $A_{630}/\text{menit}$ , volume larutan merupakan volume larutan yang digunakan dalam sumuran *microplate* yaitu 200  $\mu\text{l}$ ,  $\epsilon$  merupakan koefisien ekstingsi indoksil asetat yaitu 3,9 /mM cm, dan  $l$  merupakan tinggi larutan dalam sumuran *microplate*.

Langkah selanjutnya yaitu untuk menghitung aktivitas enzim yang lisis. Enzim asetilkolinesterase terlebih dahulu diimobilisasi pada masing-masing sol-gel yang ada pada rancangan RSM. Tahap imobilisasi adalah enzim asetilkolinesterase diambil sebanyak 5  $\mu\text{l}$  kemudian dicampurkan dengan masing-masing formulasi sol-gel dengan volume 5  $\mu\text{l}$ . Setelah dilakukan pencampuran dengan teknik pipetting maka campuran enzim dan sol-gel diteteskan pada kertas Whatman No. 1 ukuran 0,8 cm X 3 cm. Setelah itu, kertas Whatman dikering-anginkan selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah kering, kertas direndam dengan menggunakan buffer Tris-HCl pH 7,5 sebanyak 250  $\mu\text{l}$  dan diinkubasi pada selama 20 menit pada suhu ruang. Hasil rendaman buffer Tris-HCl tersebut diasumsikan sebagai absorbansi enzim yang lisis atau lisis oleh sol-gel (*unimmobilized enzyme*). Setelah itu, hasil rendaman buffer Tris-HCl dipipetting dan diambil sebanyak 195  $\mu\text{l}$  dan ditempatkan pada mikroplate. Selanjutnya ditambahkan *indoxyl acetate* 5 mg/ml sebanyak 5  $\mu\text{l}$  secara cepat. Selanjutnya, dilakukan pengukuran absorbansi sol-gel dengan menggunakan mikroplate reader setiap 2 menit pada panjang gelombang 630 nm selama 20 menit.

Kemudian, untuk menghitung laju awal reaksi enzim lisis dimasukkan dalam persamaan berikut.

$$V_0 \text{ lisis} = \frac{A_0 - A_{20}}{t_0 - t_{20}}$$

Selanjutnya, dilakukan perhitungan aktivitas enzim lisis ( $V_{\text{lisis}}$ ) dengan menghitung konsentrasi produk yang dihasilkan per satuan waktu dengan rumus yang menggunakan prinsip Hukum Lambert-Beer sebagai berikut.

$$V_{\text{lisis}} (\text{mM/menit}) = \frac{V_0 \text{ enzim lisis} \times \text{Volume larutan}}{\epsilon l}$$

Pada rumus tersebut,  $V_0$  enzim lisis merupakan laju awal reaksi enzim lisis dalam satuan  $A_{630}$ /menit, volume larutan merupakan volume larutan yang digunakan dalam sumuran *microplate* yaitu 200  $\mu$ l,  $\epsilon$  merupakan koefisien ekstingsi indoksil asetat yaitu 3,9 /mM cm, dan  $l$  merupakan tinggi larutan dalam sumuran *microplate*.

Aktivitas relatif enzim terimobilisasi dihitung menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Aktivitas relatif enzim terimobilisasi (\%)} = \frac{V \text{ bebas} - V \text{ lisis}}{V \text{ bebas}} \times 100\%$$

Pada rumus tersebut,  $V_b$  merupakan aktivitas enzim bebas sedangkan  $V_{lisis}$  merupakan aktivitas enzim lisis atau enzim yang tidak terimmobilisasi oleh sol-gel.

### c. Pemilihan Model serta analisa Model dengan ANOVA

Setelah dilakukan formulasi, maka tahap selanjutnya adalah melakukan pemilihan model yang sesuai pada penelitian. Beberapa model yang terdapat pada desain ini antara lain adalah *Linear*, *Quadratic*, dan *Cubic*. Pemilihan model tersebut terjadi berdasarkan perhitungan menggunakan *Design Expert* 7.1.6 dengan jumlah kuadrat dari urutan model (*Sequential Model Sum of Squares*), uji ketidaktepatan (*Lack of Fit Test*) dan ringkasan model statistik (*Summary of Statistic*). Pemilihan model berdasarkan jumlah kuadrat (*Sequential Model Sum of Squares*) didasarkan model diterima apabila nilai  $P < 5\%$  yang menunjukkan bahwa peluang kesalahan model kurang dari 5%. Uji ketidaktepatan model (*Lack of Fit Test*) didasarkan pada model diterima apabila nilai  $P > 5\%$  karena suatu model dianggap tepat apabila uji ketidaktepatan bersifat tidak nyata. Sedangkan pemilihan model dengan ringkasan model statistik (*Summary of Statistic*) merupakan penentuan model dengan nilai *adjusted R<sup>2</sup>* terbaik dan nilai *predicted R<sup>2</sup>* terbaik.

Selanjutnya, setelah didapatkan model yang sesuai dilakukan analisa ragam (ANOVA) terhadap model yang terpilih yang bertujuan untuk mengetahui adanya interaksi antara dua faktor yaitu rasio molar TEOS dengan  $H_2O$  dan konsentrasi NaOH terhadap respon jumlah dan aktivitas enzim asetilkolinesterase terimobilisasi.

### d. Penentuan Kondisi Optimum/ Optimasi

Dari hasil analisa respon, *software Design Expert* juga akan menyarankan hasil formulasi sol-gel yang optimal beserta dengan perkiraan nilai respon

jumlah dan aktivitas enzim terimobilisasi yang terbaik. Selain memberikan prediksi nilai respon, program *Design Expert* juga memberikan *prediction interval* (PI). PI merupakan rentang yang menunjukkan hasil pengukuran respon berikutnya dengan kondisi sama pada taraf signifikansi 5%.

#### e. Verifikasi Hasil Optimasi

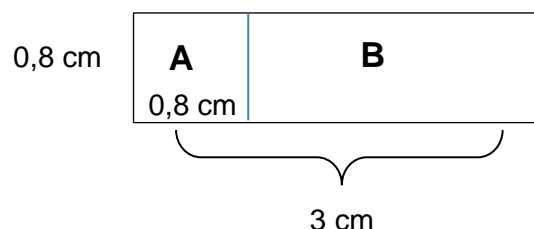
Setelah didapatkan hasil optimasi maka dilakukan pembuatan formulasi sol-gel yang sesuai dengan rancangan optimasi tersebut. Selanjutnya, dilakukan pengujian respon jumlah dan aktivitas enzim terimobilisasi serta dilakukan verifikasi dengan dua kali ulangan. Tujuan dilakukan verifikasi adalah untuk mengetahui apakah respon yang dihasilkan sesuai dengan respon perkiraan yang dihasilkan oleh *software Design Expert*. Apabila nilai prediksi dan hasil penelitian yang tidak lebih dari 5% mengindikasikan bahwa model tersebut cukup tepat dan dengan demikian solusi variabel bebas yang diberikan dapat diterima.

#### 3.4.2 Metode Penelitian Tahap II

Metode penelitian II adalah pembuatan biosensor yang terdiri dari preparasi *platform*, preparasi sol-gel dan fabrikasi biosensor.

##### a. Preparasi Platform

*Platform* dari biosensor ini terdiri dari dua bagian yaitu zona reaksi dan pegangan. Platform ini dibuat dengan menggunakan kertas Whatman nomor #1 dan dipotong dengan ukuran 0,8 cm X 3 cm. Zona reaksi platform berukuran 0,8 cm X 0,8 cm. Kemudian untuk membatasi zona reaksi dengan pegangan *platform*, maka sisa dari zona reaksi tersebut dilapisi dengan kertas laminasi doff. Desain *platform* dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



**Gambar 3. 1** Desain *Platform* biosensor

Keterangan :

A : Zona reaksi

B : Pegangan

b. Preparasi Sol-gel Hasil Optimasi

Preparasi sol-gel berbasis silika dapat dilakukan dengan beberapa tahapan yang merupakan modifikasi dari Kaur *et al.* (2011) sebagai berikut. Akuabides sesuai dengan rasio molar hasil optimasi RSM dicampur dengan ethanol p.a sebanyak 570  $\mu$ l dan diaduk dengan *magnetic stirer* 400 rpm selama 3 menit. Setelah itu, ditambahkan TEOS dengan volume sesuai rasio molar optimasi RSM seperti pada **Tabel 3.3** dan diaduk dengan *magnetic stirer* 400 rpm. Langkah terakhir, ditambahkan NaOH sebanyak 10  $\mu$ l dengan konsentrasi sesuai dengan rancangan RSM seperti pada **Tabel 3.3** dan diaduk dengan *magnetic stirer* pada kecepatan 400 rpm. Sol-gel kemudian dimasukkan ke dalam botol vial ukuran 5 ml dan disimpan di refrigerator selama 2 hari.

c. Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim dilakukan dengan tahapan enzim asetilkolinesterase dalam buffer-Tris HCl 20 mM pH 7,5 diambil sebanyak 5  $\mu$ l dan dicampurkan dengan sol-gel hasil optimasi sebanyak 5  $\mu$ l. Pencampuran enzim dan sol-gel tersebut dilakukan dengan menggunakan teknik *pipetting*.

d. Fabrikasi Biosensor

Setelah didapatkan hasil imobilisasi enzim dalam sol-gel, setelah itu dilakukan fabrikasi dengan cara imobilisasi enzim dalam sol-gel tersebut ditetaskan pada zona reaksi *platform*. Kemudian, sol-gel pada biosensor dibiarkan mengering di suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan penambahan *indoxyl acetate* 5 mg/ml dan ditunggu perubahan warna yang terjadi selama 20 menit.

**3.5 Uji Kinetika Enzim Bebas dan Enzim Terimobilisasi (Modifikasi Yotova dan Medhat, 2012)**

Tahapan uji kinetika enzim bebas dan enzim terimobilisasi dilakukan untuk mengetahui perbandingan kinetika reaksi enzim asetilkolinesterase yang bebas dan terimobilisasi. Uji kinetika enzim bebas dilakukan dengan sebanyak 190  $\mu$ l buffer Tris-Cl pH 7,5 dimasukkan ke dalam *microplate* setelah itu ditambahkan 5  $\mu$ l enzim bebas substrat 5  $\mu$ l *indoxyl acetate* dengan konsentrasi 0, 1, 3, 5, dan 7 mg/ml. Setelah itu, dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 630 nm selama 20 menit dengan menggunakan *microplate reader*. Sedangkan untuk uji kinetika enzim terimobilisasi dilakukan dengan biosensor



yang telah difabrikasi direndam dalam 250  $\mu\text{l}$  buffer Tris-Cl pH 7,5 selama 15 menit. Hasil rendaman tersebut diambil sebanyak 195  $\mu\text{l}$  dan dimasukkan pada *microplate*. Setelah itu, ditambahkan substrat 5  $\mu\text{l}$  *indoxyl acetate* dengan konsentrasi 0, 1, 3, 5, dan 7 mg/ml. Setelah itu, dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 630 nm selama 20 menit.

Setelah didapatkan absorbansi enzim bebas dan enzim terimobilisasi, kemudian hasil absorbansi tersebut dimasukkan dalam perhitungan aktivitas enzim. Tahap selanjutnya, dibuat kurva Lineweaver-Burk dengan sumbu x merupakan nilai  $1/S$  dimana S merupakan konsentrasi substrat *indoxyl acetate* dan sumbu y adalah  $1/V_0$  dimana  $V_0$  merupakan nilai aktivitas relatif enzim.

### **3.6 Tahap Uji Kualitas Biosensor**

#### **3.6.1 Uji Batas Deteksi (Modifikasi Guo et al., 2013)**

Uji batas deteksi dilakukan untuk mengetahui konsentrasi target analit (pestisida) terendah yang dapat dideteksi oleh biosensor. Uji tersebut dapat dilakukan dengan melakukan tahapan sebagai berikut, pestisida jenis organofosfat yang dilarutkan dalam akuades dengan berbagai konsentrasi yaitu 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 dan 200 ppm. Kemudian masing-masing konsentrasi ditetaskan pada biosensor dan diamati perubahan intensitas warna yang terjadi yaitu dari biru indigo menjadi warna putih dan warna tersebut dapat bertahan selama 30 menit. Batas deteksi yang dipilih merupakan dimana intensitas warna biosensor berubah menjadi putih.

#### **3.6.2 Uji Waktu Respon (Guo et al., 2013)**

##### **1. Uji Waktu Respon Terhadap Substrat**

Uji waktu respon dilakukan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan oleh enzim asetilkolinesterase dalam mendeteksi substrat *indoxyl acetate*. Uji ini dilakukan dengan *indoxyl acetate* sebanyak 5  $\mu\text{l}$  pada biosensor. Dilakukan dokumentasi dengan *scanner* EPSON TX121 pada menit ke 0, 2, 4, 6, 8, 10.

##### **2. Uji Waktu Respon Terhadap Pestisida**

Uji waktu respon dilakukan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan oleh biosensor dalam mendeteksi target analit (pestisida). Uji ini dilakukan dengan meneteskan pestisida konsentrasi 0, 1, 5, 10, 25 dan 200 ppm sebanyak 15  $\mu\text{l}$  pada biosensor dan dilakukan 4 kali setiap 5 menit. Dilakukan dokumentasi dengan *scanner* EPSON TX121 pada menit ke 0, 2, 4, 6, 8, 10.

### **3.6.3 Uji Stabilitas Biosensor terhadap Suhu (Guo et al., 2013)**

Stabilitas biosensor terhadap suhu diartikan sebagai suhu terbaik untuk kondisi penyimpanan biosensor hingga kehilangan kemampuan deteksi pada jangka waktu penyimpanan yang sama. Suhu yang digunakan dalam uji ini adalah 4°C (suhu refrigerator), 25°C (ruang terbuka laboratorium), dan 40°C (inkubator) selama 24 jam. Pada uji stabilitas biosensor terhadap suhu juga dilakukan pada perlakuan kontrol (imobilisasi enzim teknik adsorpsi) dengan cara enzim asetilkolinesterase diambil sebanyak 5 µl dan diteteskan pada kertas Whatman. Kemudian, masing-masing perlakuan diuji jumlah enzim terimobilisasi dan aktivitas enzim untuk mengetahui stabilitas enzim terhadap suhu.

### **3.6.4 Uji Stabilitas Biosensor terhadap Waktu (Guo et al., 2013)**

Waktu penyimpanan biosensor merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui rentang waktu dimana biosensor masih dapat digunakan tanpa mengalami penurunan kualitas yang signifikan. Uji ini dilakukan dengan cara biosensor dengan perlakuan terbaik disimpan pada hari ke-1, 2, 3, 4, dan 5 dalam suhu 4°C. Pada uji stabilitas biosensor terhadap waktu juga dilakukan pada perlakuan kontrol (imobilisasi enzim teknik adsorpsi) dengan cara enzim asetilkolinesterase diambil sebanyak 5 µl dan diteteskan pada kertas Whatman. Kemudian, masing-masing perlakuan diuji jumlah enzim terimobilisasi dan aktivitas enzim untuk mengetahui stabilitas enzim terhadap waktu.

### **3.6.5 Uji Akurasi Biosensor (Martinez et al., 2008)**

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya yang dinyatakan dalam persen (Riyanto, 2014). Menurut Hermita (2004) akurasi ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Pengujian ini dilakukan untuk pengembangan biosensor menjadi alat yang dapat mendeteksi residu pestisida secara semikuantitatif (Sakti, 2017).

Prosedur pengujian akurasi ini yaitu membuat regresi linear dari rerata nilai *mean* pada pengujian residu pestisida 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Rentang nilai tersebut didapatkan dari 0 ppm sebagai kontrol atau tanpa residu pestisida, sedangkan 5 ppm merupakan batas maksimal residu profenofos menurut SNI. Setelah didapatkan rerata nilai *mean* dari beberapa *range* konsentrasi pestisida

tersebut, maka diperoleh suatu persamaan  $y = ax + b$ . Selanjutnya membuat pestisida dengan konsentrasi 1 dan 2 ppm (sebagai  $X_0$ ). Konsentrasi pestisida 1 dan 2 ppm ini dijadikan sebagai acuan karena memiliki nilai *mean* yang tidak jauh beda dari nilai *mean* kontrol sehingga perlu diuji akurasi nya. Pestisida yang digunakan yakni pestisida komersil dengan bahan aktif profenofos 500 EC merek dagang Callicron™ dimana profenofos ini merupakan golongan organofosfat. Kemudian pestisida tersebut diteteskan ke biosensor masing-masing 15 µl sebanyak 4 kali dengan interval waktu 5 menit. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi pada biosensor selama 20 menit. Kemudian intensitas warna biru yang terbentuk diukur dan dikuantifikasi melalui *scanner* EPSON TX121. Adapun nilai *mean* tersebut dimasukkan ke dalam persamaan pada regresi linear sehingga diperoleh nilai konsentrasi pestisida hasil analisis (nilai  $X_1$ ). Selanjutnya dapat dihitung nilai prosentase akurasi biosensor yang secara matematis dirumuskan sebagai berikut:

$$Akurasi (\%) = \frac{X_1}{X_0} \times 100\%$$

Keterangan dari rumus tersebut adalah sebagai berikut.

$X_1$  = nilai konsentrasi pestisida hasil analisis

$X_0$  = nilai konsentrasi pestisida yang sebenarnya

### 3.6.6 Aplikasi Biosensor pada Sampel Sayuran (Apillux et al., 2015)

Setelah dilakukan fabrikasi biosensor dengan formulasi sol-gel yang optimal, maka dilakukan pengujian aplikasi biosensor tersebut pada sayur selada. Sayur selada yang digunakan ada dua macam yaitu selada organik dan selada yang ada di Pasar Dinoyo. Tujuan aplikasi biosensor pada selada organik adalah untuk mengetahui nilai akurasi biosensor pada sampel selada. Sedangkan aplikasi pada sayur selada yang ada di pasar dilakukan untuk mengetahui tingkat kontaminasi residu pestisida pada selada yang dijual di Pasar Dinoyo.

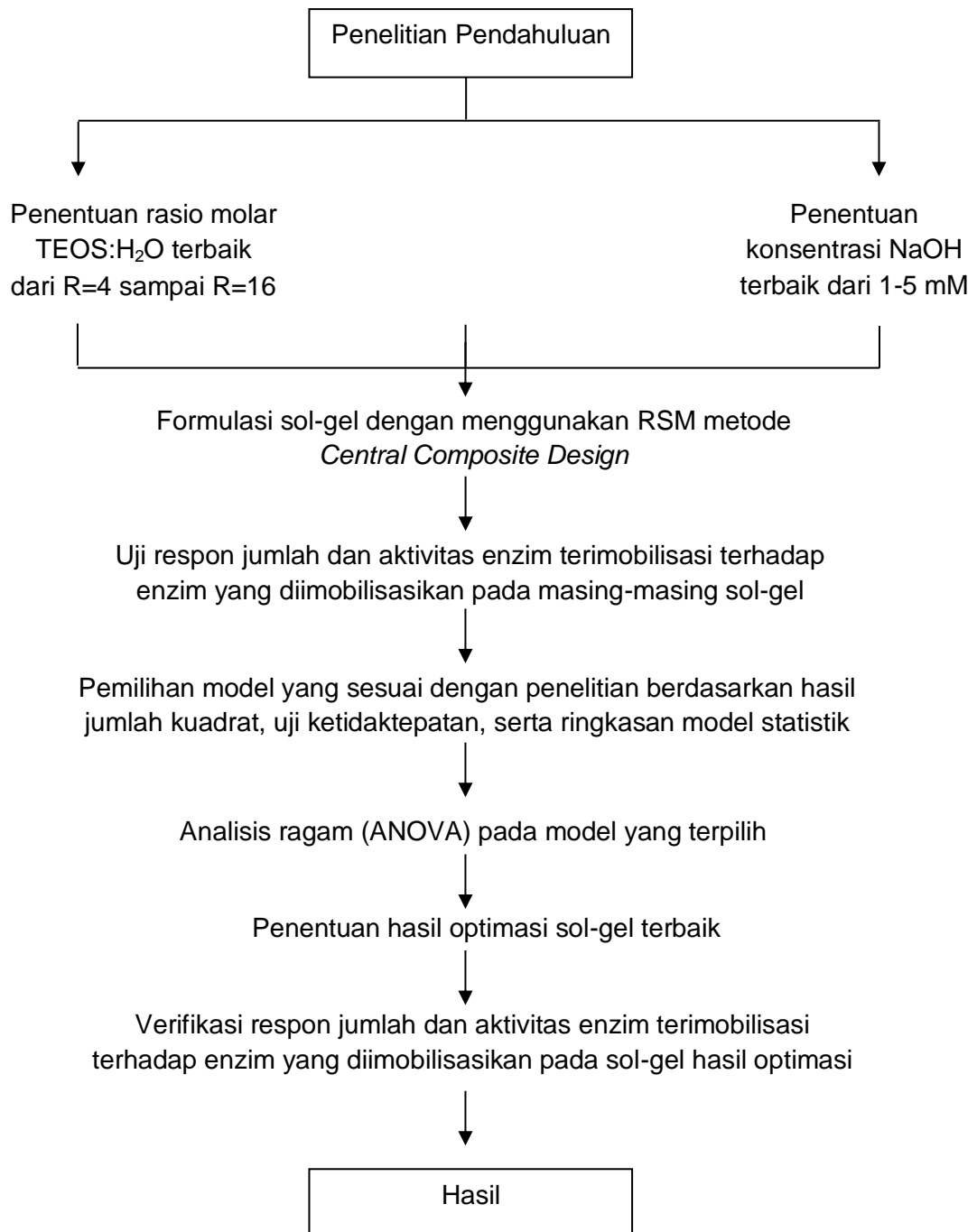
Aplikasi biosensor pada selada organik dilakukan sebagai berikut. Sayur selada organik merek Kaliandra ditimbang 5 gram terlebih dahulu kemudian disemprotkan 5 ml pestisida merek dagang Callicron™ (bahan aktif profenofos) dengan konsentrasi 0 ppm, 1 ppm, 5 ppm, dan 10 ppm. Kemudian sayuran dimasukkan ke dalam wadah plastik dan dilakukan inkubasi selama 24 jam di suhu ruang. Kemudian selada dilakukan pencacahan dan direndam pada buffer Tris-Cl 20 mM pH 7,5 dengan volume 5 ml selama 15 menit. Tujuannya yaitu untuk melarutkan residu pestisida pada selada. Selanjutnya rendaman buffer

tersebut divortex dan diambil sebanyak 15  $\mu$ l yang diberikan sebanyak 4 kali dengan rentang waktu 5 menit. Tahap berikutnya, diamati perubahan warna pada biosensor selama 20 menit dan dilakukan dokumentasi dengan menggunakan *scanner* EPSON TX121 lalu diukur nilai *mean pada* zona reaksi biosensor dan dilakukan uji akurasi.

Sedangkan untuk sampel selada yang ada di pasaran diambil dengan teknik selada tersebut diambil dari 5 pedangang sayur di Pasar Dinoyo. Sampel sayuran tersebut ditimbang sebanyak 5 gram kemudian ditumbuk halus dan dimasukkan dalam 20 mM larutan buffer Tris-Cl pH 7,5 selama 10 menit. Diambil bagian supernatan larutan tersebut menggunakan pipet tetes dan ditetaskan pada bagian sol-gel biosensor. Setelah itu, diamati perubahan intensitas warna yang terjadi. dan dilakukan dokumentasi dengan menggunakan *scanner* EPSON TX121 dan diukur nilai *mean pada* zona reaksi biosensor.

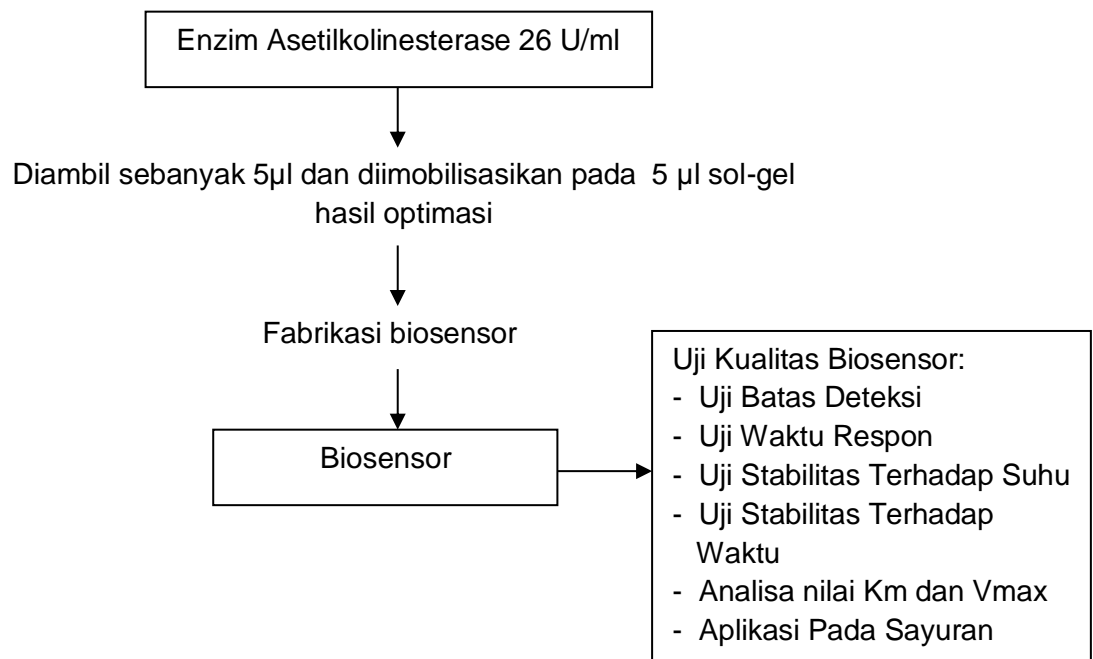
### 3.7 Diagram Alir

#### 3.7.1 Diagram Alir Penelitian Tahap I



**Gambar 3.2** Diagram Alir Penelitian Tahap I

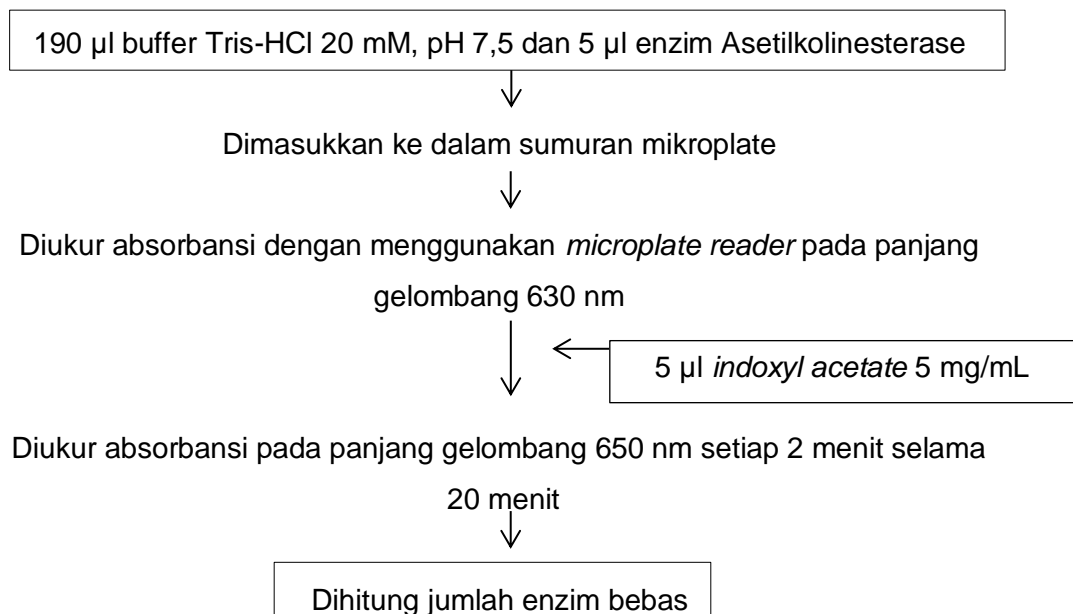
### 3.7.2 Diagram Alir Penelitian Tahap II



**Gambar 3.3** Diagram Alir Penelitian Tahap II

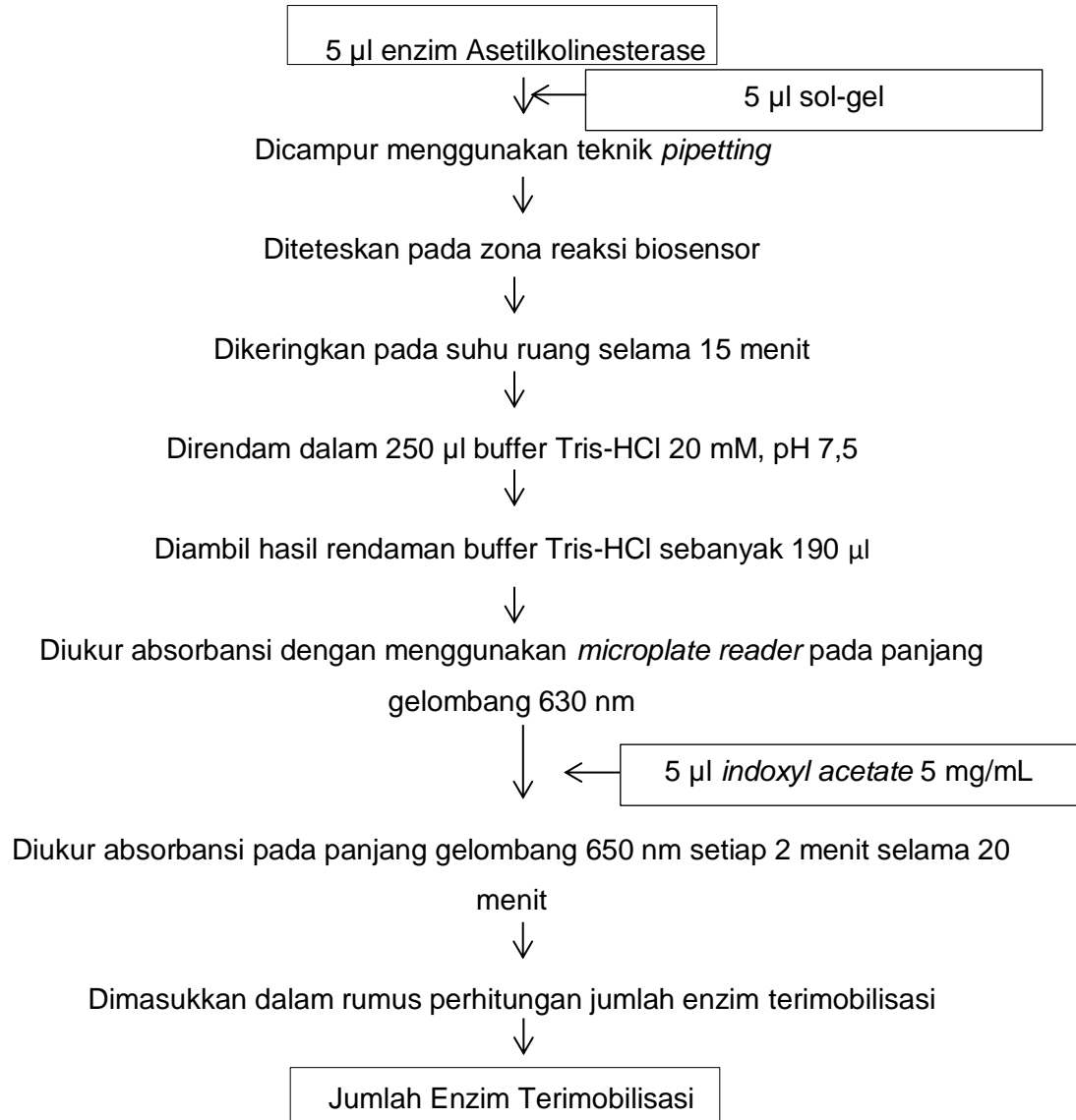
### 3.7.3 Penentuan Respon Jumlah Enzim Terimobilisasi

#### 1. Jumlah Enzim Bebas



**Gambar 3.4** Diagram Alir Penentuan Jumlah Enzim Bebas

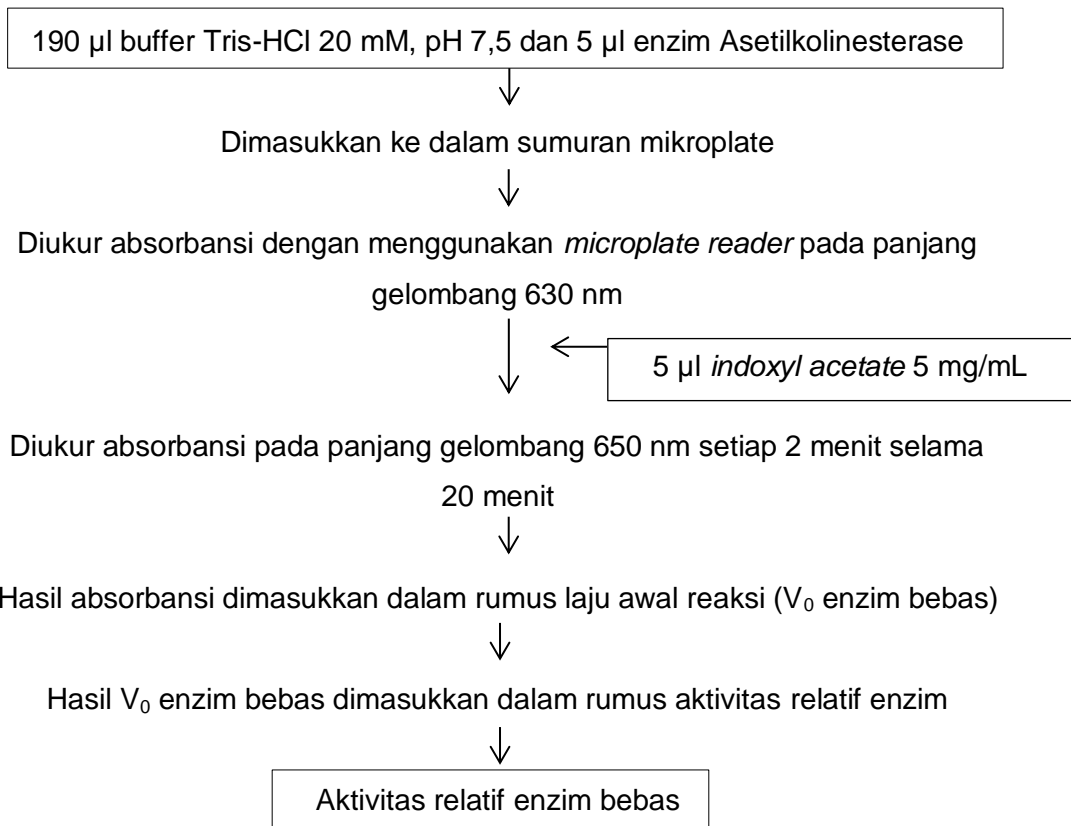
## 2. Jumlah Enzim Terimobilisasi



**Gambar 3.5** Diagram Alir Penentuan Jumlah Enzim Terimobilisasi

### 3.7.4 Penentuan Respon Aktivitas Relatif Enzim

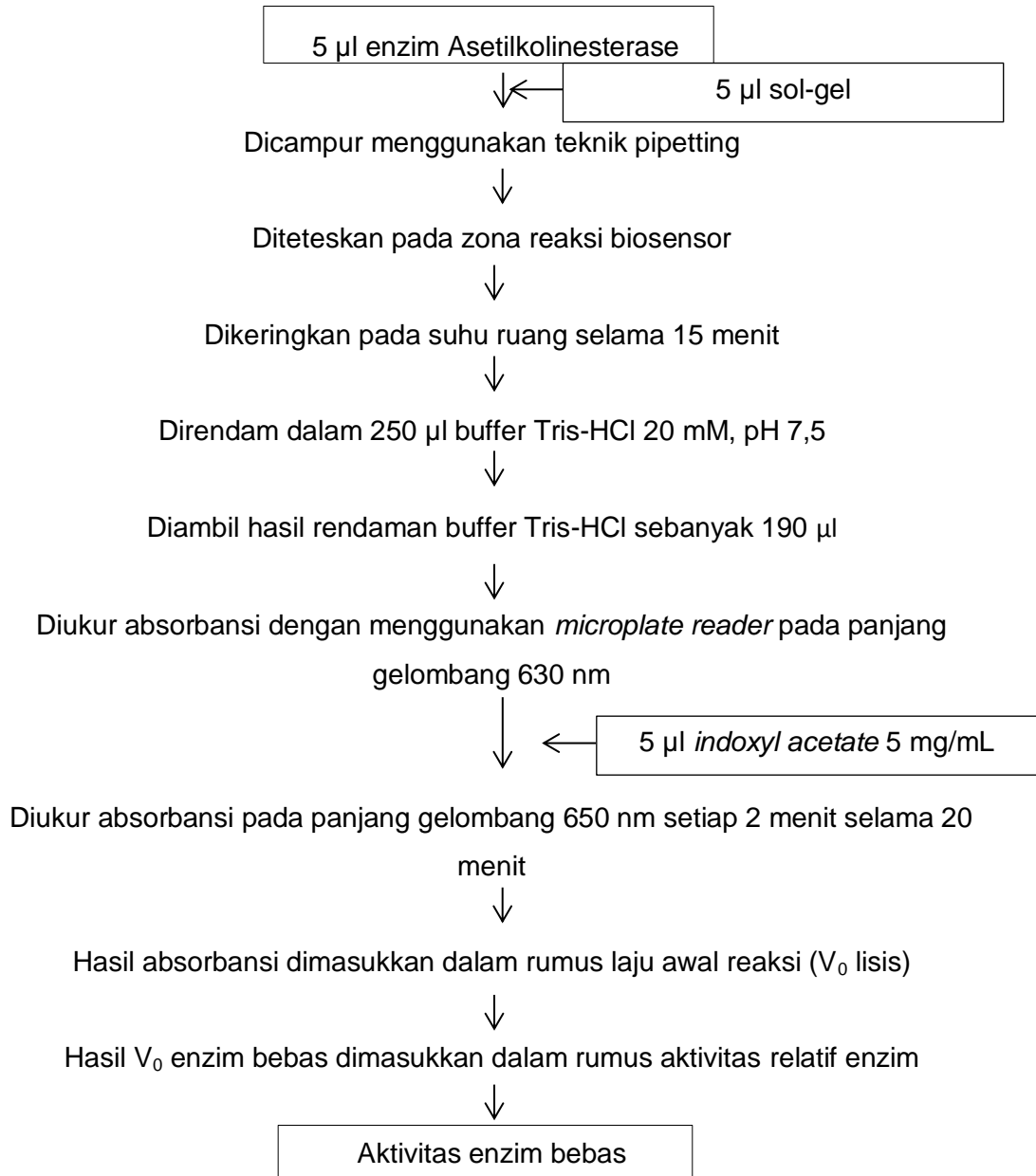
#### 1. Aktivitas Enzim Bebas



**Gambar 3.6** Diagram Alir Penentuan Aktivitas Relatif Enzim Bebas

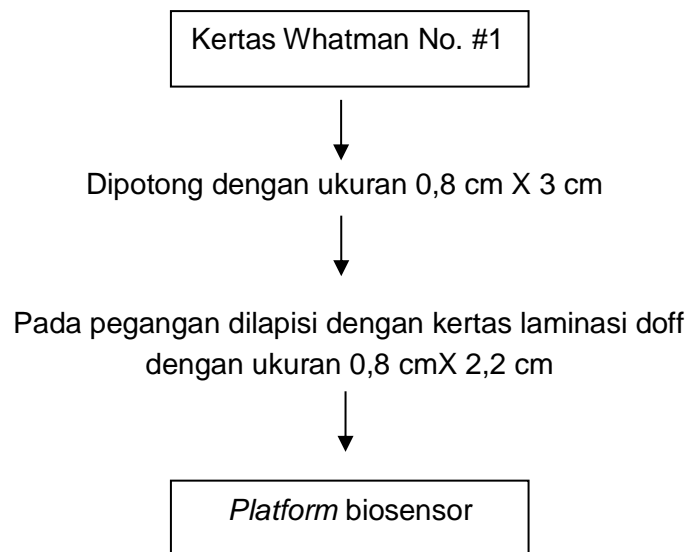


## 2. Aktivitas Relatif Enzim Terimobilisasi



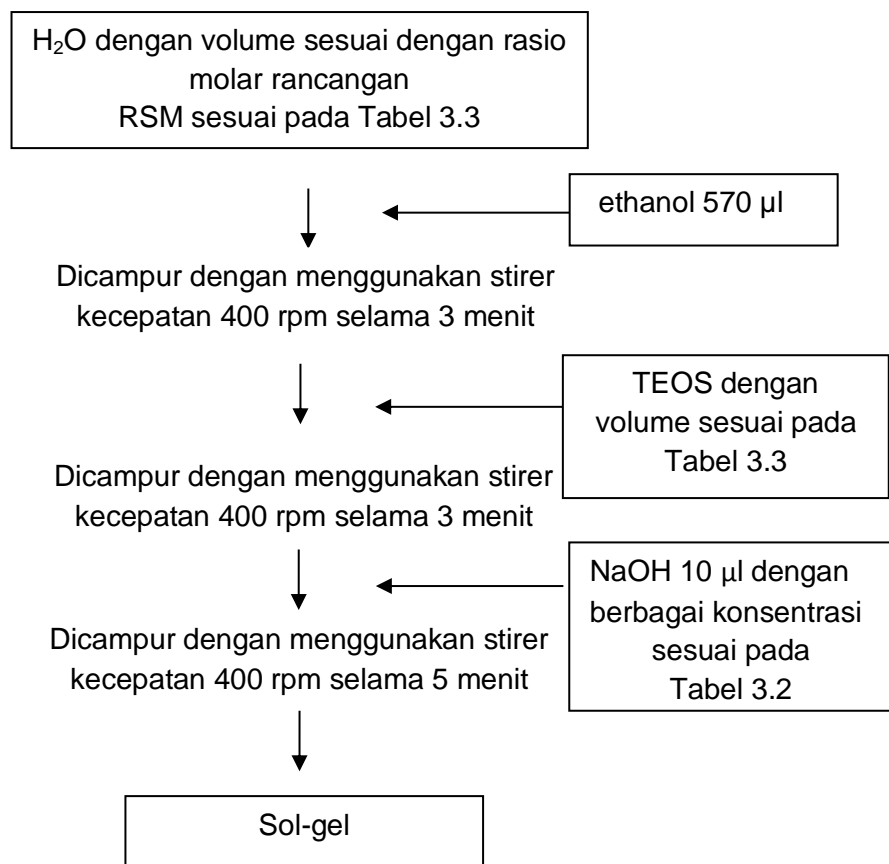
**Gambar 3.7** Diagram Alir Penentuan Aktivitas Enzim Terimobilisasi

### 3.7.5 Preparasi *Platform* Biosensor



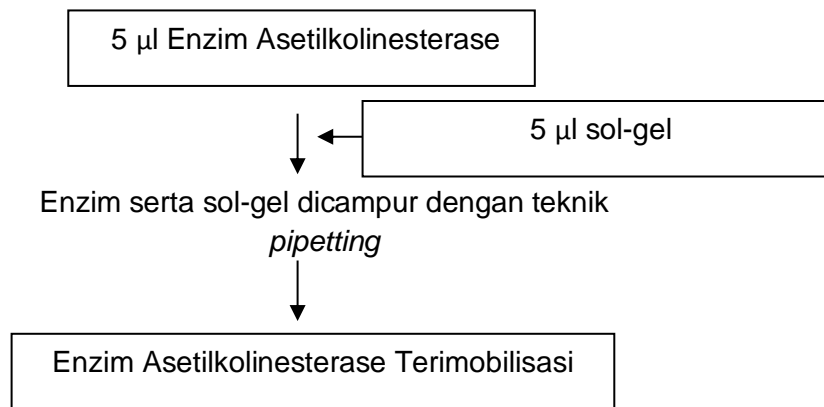
**Gambar 3.8** Diagram Alir Preparasi *Platform* Biosensor

### 3.7.6 Preparasi Sol-gel



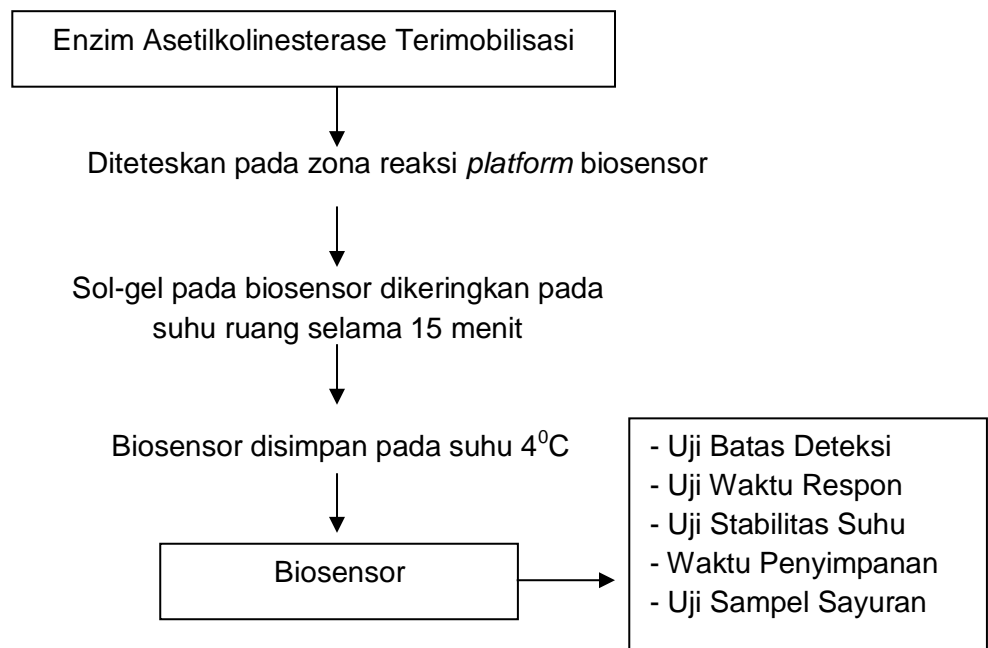
**Gambar 3.9** Diagram Alir Preparasi Sol-gel

### 3.7.7 Imobilisasi Enzim



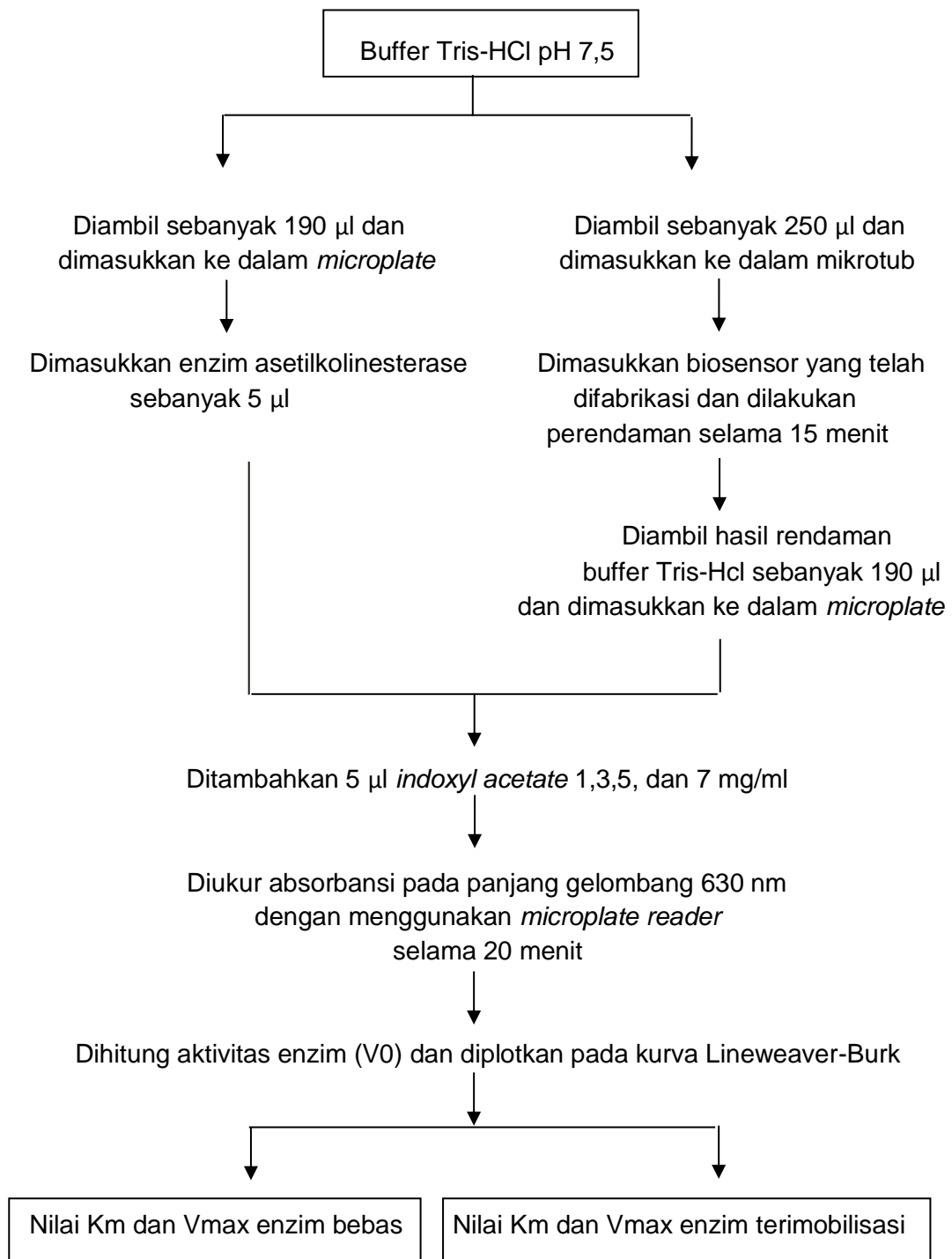
**Gambar 3.10** Diagram Alir Imobilisasi Enzim

### 3.7.8 Fabrikasi Biosensor



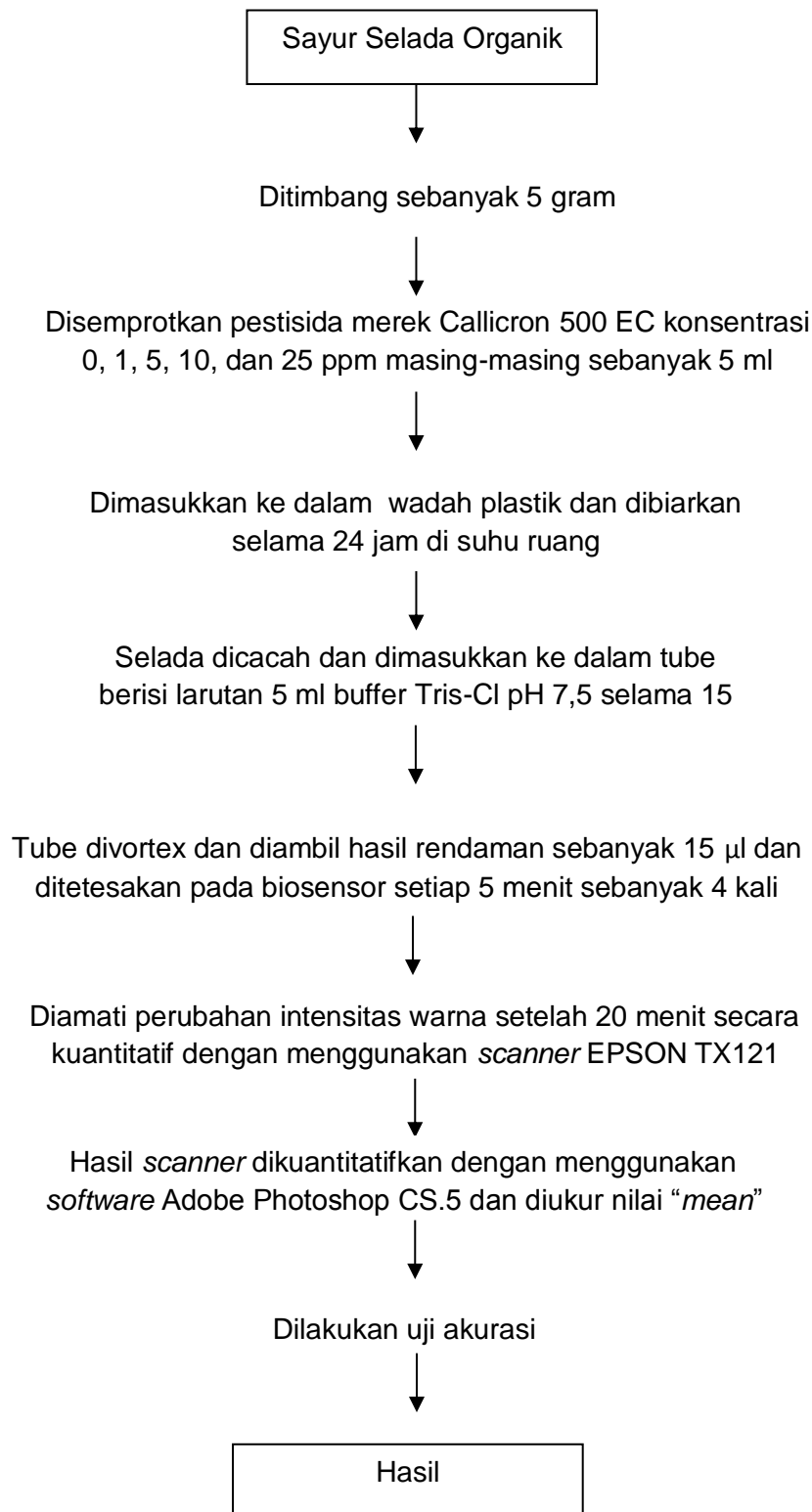
**Gambar 3.11** Diagram Alir Fabrikasi Biosensor

### 3.6.9 Uji Kinetika Enzim Bebas dan Enzim Terimobilisasi



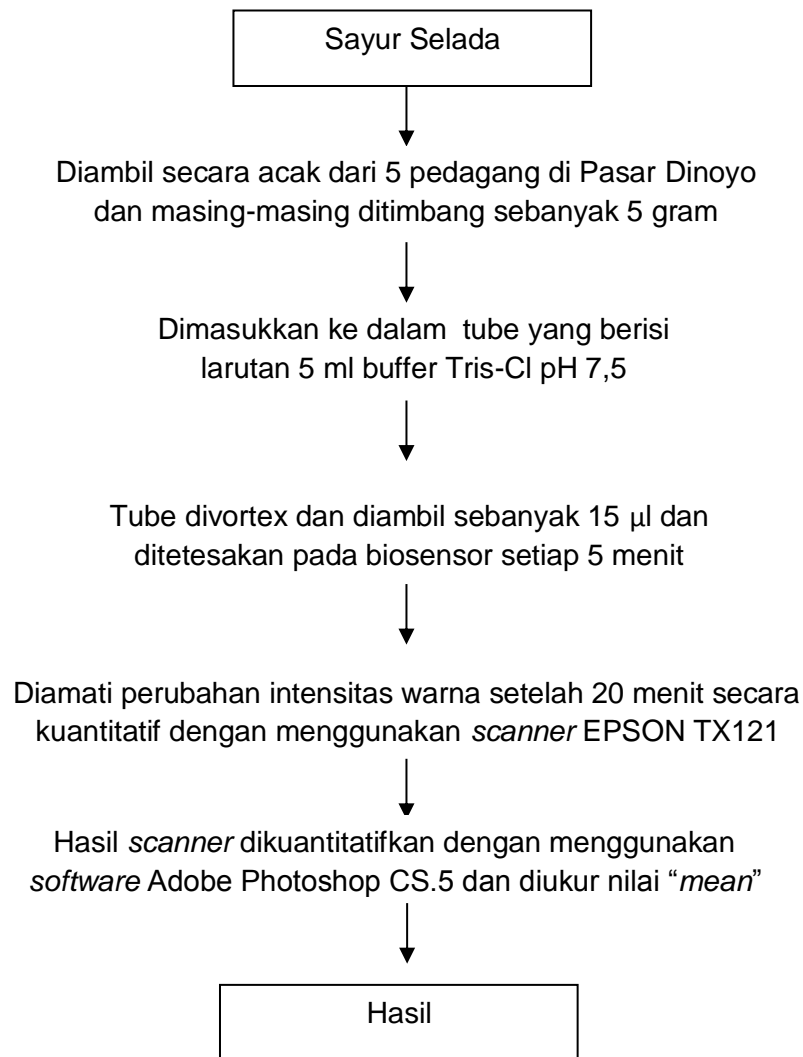
**Gambar 3.12** Diagram Alir uji Kinetika Enzim Bebas dan Enzim Terimobilisasi

### 3.6.10 Uji Biosensor pada Sampel Sayur Selada Organik



**Gambar 3.13** Diagram Alir Uji Biosensor pada Sayur Selada Organik

### 3.6.11 Uji Biosensor pada Sampel Sayur Selada di Pasar Dinoyo



**Gambar 3.14** Diagram Alir Uji Biosensor pada Sampel Selada di Pasar Dinoyo

## IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ini dilakukan untuk memperoleh formulasi terbaik sol-gel terbaik serta komponen-komponen lain yang dapat mempengaruhi kualitas biosensor. Pada penelitian pendahuluan ini dilakukan beberapa tahap yaitu konfirmasi kerja enzim asetilkolinesterase, pemilihan jenis kertas sebagai *platform* biosensor, jenis katalis sol-gel, rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O terbaik serta konsentrasi NaOH terbaik. Konfirmasi kerja enzim asetilkolinesterase dilakukan untuk mengetahui adanya reaksi antara enzim dengan substrat kromogenik yang digunakan yaitu *indoxyl acetate* yang ditandai dengan terbentuknya produk indigo yang berwarna biru saat terjadi reaksi hidrolisis *indoxyl acetate* oleh enzim asetilkolinesterase. Pemilihan jenis kertas merupakan faktor yang penting karena kertas merupakan matriks atau *platform* yang digunakan sebagai media adsorpsi enzim. Jenis katalis pad sol-gel juga berperan pada pembentukan pori-pori sol-gel yang digunakan sebagai media imobilisasi enzim. Sedangkan penelitian pendahuluan rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O dan konsentrasi NaOH digunakan untuk formulasi sol-gel terbaik sebagai media *entrapment* enzim asetilkolinesterase.

#### 4.1.1 Konfirmasi Kerja Enzim Asetilkolinesterase (AChE)

Konfirmasi kerja enzim dilakukan untuk memastikan bahwa enzim asetilkolinesterase memiliki aktivitas untuk menghidrolisis *indoxyl acetate* sebagai substrat menjadi *indoxyl*. Ketika *indoxyl* bereaksi dengan udara maka akan terbentuk *indigo carmine* yaitu produk yang berwarna biru. Perubahan warna menjadi biru inilah yang menjadi indikator adanya aktivitas enzim asetilkolinesterase.



(a) Kontrol (tanpa substrat)    (b) Dengan Substrat *Indoxyl Acetate* 5 mg/ml

**Gambar 4.1** Hasil Konfirmasi Kerja Enzim Asetilkolinesterase

Berdasarkan Gambar 4.1 tersebut dapat diketahui pada kontrol (tanpa substrat *indoxyl acetate*) tidak ada perubahan warna pada kertas Whatman. Hal ini dikarenakan tidak ada produk hasil pemecahan substrat kromogenik oleh enzim asetilkolinesterase. Sedangkan pada perlakuan (b) terjadi perubahan warna pada kertas Whatman menjadi biru. Hal ini disebabkan pada perlakuan tersebut terjadi reaksi hidrolisis substrat *indoxyl acetate* menjadi *indigo carmine* karena terjadi perubahan warna menjadi biru oleh enzim asetilkolinesterase. Sehingga dapat dikatakan bahwa enzim asetilkolinesterase yang digunakan dalam penelitian ini memiliki aktivitas untuk menghidrolisis substrat tersebut.

#### 4.1.2 Pemilihan Jenis Kertas

Kertas merupakan bahan *platform* atau tempat adsorpsi enzim. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa kertas Whatman merupakan salah satu material biopolimer yang telah banyak diterapkan untuk *platform* biosensor (Guan *et al.*, 2015). Kelebihan kertas sebagai *platform* yaitu permukaannya mudah dimodifikasi, memiliki porositas yang baik untuk imobilisasi, serta bersifat *biodegradable*. Dengan demikian, pemilihan jenis kertas merupakan faktor yang penting pada pembuatan biosensor ini. Pada penelitian ini, beberapa jenis kertas yang diteliti yaitu kertas Whatman No. 1, Whatman No. 41, Whatman No. 42 dan Whatman No. 91 sebagai *platform* biosensor. Indikator yang digunakan dalam pemilihan jenis kertas yang terbaik sebagai *platform* adalah hasil absorbansi buffer yang digunakan untuk merendam biosensor dengan *platform* dari berbagai jenis kertas tersebut.

Langkah pertama yang dilakukan untuk mengetahui jenis kertas yang terbaik yaitu enzim asetilkolinesterase diambil sebanyak 5 µl dan diteteskan pada masing-masing kertas. Kemudian kertas dikeringkan pada suhu ruang selama 15 menit. Tujuannya yaitu agar enzim teradsorpsi atau terikat pada kertas. Selanjutnya kertas direndam dalam buffer Tris-Cl 20 mM pH 7,5 sebanyak 210 µl selama 15 menit. Selanjutnya, hasil rendaman buffer tersebut diambil sebanyak 195 µl dan diteteskan dengan *indoxyl acetate* 5mg/ml sebanyak 5 µl. Tujuan penambahan *indoxyl acetate* adalah agar bereaksi dengan enzim asetilkolinesterase yang tidak terikat dengan kertas sehingga menghasilkan warna biru. Intensitas warna biru tersebut diukur dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 630 nm



untuk mengetahui jumlah enzim yang tidak terikat dengan kertas yang disajikan pada **Tabel 4.1**.

**Tabel 4.1** Pengaruh Jenis Kertas Terhadap Hasil Absorbansi Buffer Rendaman

Jenis Kertas	Rerata Absorbansi pada 630 nm
Whatman No. 1	0,051
Whatman No. 41	0,058
Whatman No. 42	0,074
Whatman No. 91	0,065

Keterangan: Setiap data yang tercantum merupakan rerata dari dua kali ulangan

Berdasarkan **Tabel 4.1** diketahui bahwa rerata absorbansi terendah didapatkan pada kertas Whatman No. 1. Hal tersebut menunjukkan bahwa kertas Whatman No. 1 memiliki kemampuan untuk mengikat enzim paling baik dibandingkan kertas yang lain. Hal ini dikarenakan hasil absorbansi yang dihasilkan merupakan warna biru yang terbentuk dari hasil reaksi enzim asetilkolinesterase dengan *indoxyl acetate*. Warna biru tersebut berkorelasi dengan jumlah enzim yang tidak terikat atau enzim yang lepas saat dilakukan perendaman. Semakin rendah nilai absorbansi, maka warna biru yang dihasilkan semakin rendah hal tersebut menunjukkan semakin sedikit jumlah enzim asetilkolinesterase yang dapat memecah substrat kromogenik *indoxyl acetate*. Semakin sedikit jumlah enzim asetilkolinesterase yang tidak terikat dengan kertas maka semakin efektif kertas dalam mengikat enzim. Sehingga kertas Whatman No. 1 merupakan kertas yang memiliki kemampuan lebih baik untuk mengikat enzim dibandingkan dengan jenis kertas yang lain.

Perbedaan kemampuan kertas dalam mengikat enzim ini dikarenakan adanya perbedaan bahan baku pada kertas yang digunakan. Pada kertas Whatman No. 1 dan No. 92 terbuat dari bahan baku selulosa, sedangkan kertas Whatman No. 41, No. 42, terbuat dari serat kapas. Selulosa memiliki gugus hidroksil yang dapat berikatan dengan enzim (Sakti, 2017). Sedangkan ikatan antara serat kapas dan enzim lebih lemah daripada selulosa. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Goncalves *et al.* (2014), menyatakan bahwa enzim  $\beta$ -D-fruktofuranosidase yang diimobilisasi pada kertas Whatman yang berbahan baku selulosa memiliki aktivitas enzim lebih tinggi yaitu 55,27% dibandingkan dengan enzim yang diimobilisasi pada serat kapas yaitu 8,77%.

#### 4.1.3 Jenis Katalis Sol-gel

Katalis pada sol-gel memiliki tujuan untuk mempercepat proses pembentukan silika sol-gel. Perubahan pH pada permukaan silika dengan menggunakan asam atau basa sebagai katalis dapat meningkatkan proses hidrolisis atau kondensasi. Jenis katalis asam cenderung meningkatkan proses kondensasi dan menghasilkan ukuran pori-pori sol-gel yang lebih kecil serta struktur yang kompak. Jenis asam yang sering digunakan untuk katalis sol-gel adalah HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Sedangkan jenis katalis basa seperti NaOH dan NH<sub>3</sub> cenderung mempercepat proses nukleasi pada hidrolisis TEOS yang menghasilkan pori-pori sol-gel lebih besar (Milea *et al.*, 2011).

Pada penelitian pendahuluan digunakan formulasi sol-gel yang mengacu pada penelitian Oujii *et al.* (2013) dengan komposisi sebagai berikut TEOS 2 ml, H<sub>2</sub>O 0,5 ml, ethanol 0,5 ml, HCl 25 µl. Berdasarkan formulasi tersebut, diketahui bahwa katalis yang digunakan yaitu katalis asam berupa HCl. Secara visual, setelah 48 jam proses *aging* hasil sol-gel yang didapatkan yaitu struktur sol-gel yang kompak. Akan tetapi, ketika diberikan substrat kromogenik *indoxyl acetate* reaksi perubahan warna yang terjadi cukup lama yaitu kurang lebih 4-5 jam. Hal ini dikarenakan struktur silika dengan katalis asam memiliki pori-pori yang kecil sehingga jumlah enzim asetilkolinesterase yang terperangkap berkurang serta substrat akan berdifusi di dalam sol-gel tersebut sehingga reaksi perubahan warna menjadi lama. Waktu respon yang lama ini dapat mengakibatkan performansi biosensor menjadi berkurang. Sehingga untuk meningkatkan sol-gel ini diganti dengan menggunakan formulasi berdasarkan Kaur *et al.* (2014), dengan formulasi sol-gel sebagai berikut 50 µl TEOS, 60 µl H<sub>2</sub>O deionisasi, ethanol 570 µl dan NaOH 5 mM sebanyak 10 µl. Berdasarkan formulasi tersebut, jenis katalis yang digunakan adalah katalis basa jenis NaOH dan didapatkan perubahan warna antara enzim asetilkolinesterase dengan substrat kromogenik *indoxyl acetate* selama 20 menit. Hal tersebut jauh lebih efektif dibandingkan dengan formulasi sebelumnya yang menggunakan katalis asam. Hal ini dikaitkan dengan katalis basa dapat mempercepat proses nukleasi TEOS pada saat hidrolisis silika dan ukuran silika yang terbentuk semakin kecil dan pori-pori antar silika yang dihasilkan semakin besar. Pori-pori antar silika inilah yang digunakan sebagai media *entrapment* enzim sehingga semakin besar pori-pori antar silika maka jumlah enzim yang terperangkap semakin banyak (Vamavakiki *et al.*, 2005). Berikut merupakan gambar visualisasi perbedaan jenis katalis terhadap ukuran partikel TEOS serta pori-pori antar partikel yang

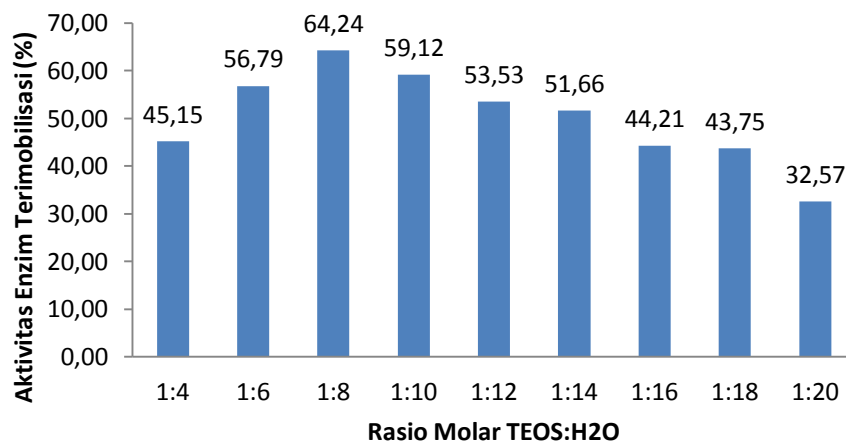
terbentuk. Partikel silika yang terbentuk disimbolkan dengan bentuk bulat sedangkan pori-pori antar partikel disimbolkan dengan area berwarna biru.



**Gambar 4.2** Visualisasi Ukuran Partikel TEOS dan Pori-pori Antar Partikel Berdasarkan Jenis Katalis

#### 4.1.4 Rasio Molar TEOS:H<sub>2</sub>O

Pada penelitian pendahuluan tahap ini dilakukan untuk mengetahui rasio molar terbaik antara TEOS dengan H<sub>2</sub>O. Tujuan dari penelitian pendahuluan ini adalah untuk mencari rasio molar TEOS dengan H<sub>2</sub>O terbaik yang akan digunakan sebagai data pusat atau *center* pada rancangan *Response Surface Methodology* (RSM). Berikut merupakan grafik pengaruh rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O terhadap aktivitas relatif enzim asetilkolinesterase yang terimobilisasi (%).

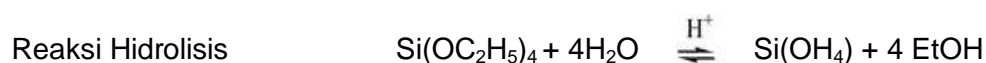


**Gambar 4.3** Pengaruh Rasio Molar TEOS:H<sub>2</sub>O Terhadap Aktivitas Relatif Enzim Asetilkolinesterase Terimobilisasi (%)

Berdasarkan **Gambar 4.3** didapatkan hasil bahwa rasio TEOS:H<sub>2</sub>O adalah 1:8. Saat rasio molar lebih dari 1:8, aktivitas relatif enzim yang terimobilisasi cenderung lebih rendah. Sedangkan pada nilai rasio molar kurang dari 1:8 memiliki aktivitas relatif enzim terimobilisasi juga cenderung menurun. Pada proses pembentukan TEOS pada sol-gel, H<sub>2</sub>O berperan sebagai agen *cross-linking* atau molekul yang membentuk cabang atau ikatan silang pada sol-gel.

Sehingga semakin banyak H<sub>2</sub>O yang digunakan pada formulasi sol-gel maka semakin banyak cabang yang terbentuk. Hal ini menyebabkan enzim menjadi terbatas untuk masuk ke dalam matriks sol-gel tersebut (Sakka, 2005). Hal tersebut juga hampir sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Biro *et al.* (2016), rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O 1:7 merupakan perbandingan rasio molar terbaik untuk media imobilisasi enzim β-D-galaktosidase untuk biosensor dengan teknik kolorimetri.

Selain itu, menurut Vidinha *et al.* (2006), meningkatnya kandungan H<sub>2</sub>O pada sol-gel dapat meningkatkan reaksi hidrolisis. Kemudian, ketika reaksi hidrolisis selesai akan dihasilkan produk berupa ethanol. Pada stokiometri reaksi hidrolisis pembentukan silika dapat diketahui bahwa setiap 1 mol TEOS yang dihidrolisis oleh 4 mol H<sub>2</sub>O akan menghasilkan produk berupa 4 mol ethanol. Sehingga ketika jumlah H<sub>2</sub>O pada formulasi sol-gel meningkat maka akan diikuti oleh meningkatnya jumlah ethanol sebagai produk reaksi. Tingginya jumlah ethanol akan berdampak pada denaturasi enzim sehingga aktivitas relatif enzim tersebut menjadi berkurang. Berikut merupakan reaksi hidrolisis TEOS atau silika oleh H<sub>2</sub>O.

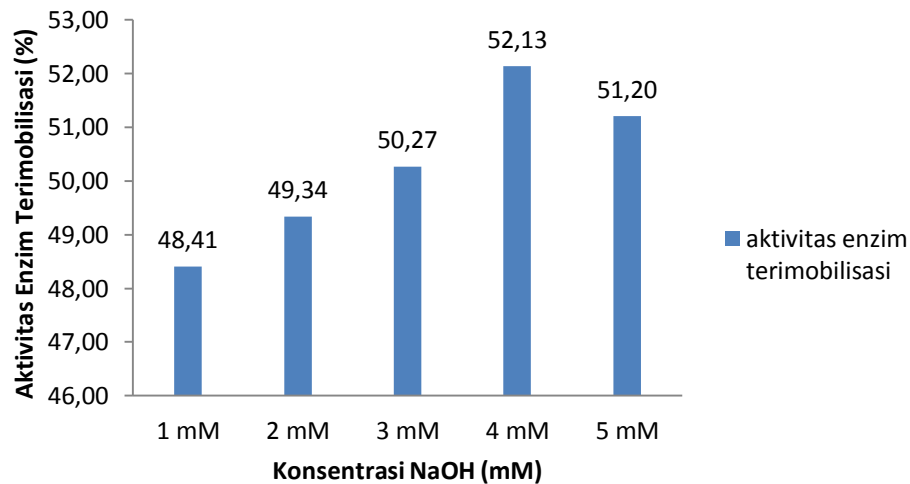


Pada penelitian pendahuluan tersebut dapat diketahui bahwa aktivitas relatif enzim terimobilisasi yang paling baik terdapat pada rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O 1:8 sehingga rasio molar tersebut dijadikan nilai *center* dalam rancangan *Response Surface Methodology* (RSM). Sedangkan data minimum yang digunakan yaitu rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O dengan perbandingan 1:4 dan data maksimum yang digunakan adalah 1:12 (interval setiap level 1:4). Hal ini dikarenakan TEOS akan terhidrolisis secara sempurna apabila 1 mol TEOS dihidrolisis dengan 4 mol H<sub>2</sub>O. Pada rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O adalah 1:4 maka silika pada TEOS akan terbentuk struktur 3 dimensi yang cocok digunakan untuk imobilisasi biomolekul seperti enzim, antibodi, jaringan, dan lain-lain (Brinker dan Scherer, 2003).

#### 4.1.5 Konsentrasi NaOH (mM)

NaOH merupakan salah satu jenis katalis basa yang berfungsi untuk mempercepat reaksi hidrolisis dalam pembentukan silika. Pada penelitian pendahuluan dengan faktor yang diteliti yaitu konsentrasi NaOH menggunakan tingkatan konsentrasi 1, 2,3, 4 dan 5 mM. Tujuan dari

penelitian pendahuluan ini adalah untuk mencari konsentrasi NaOH terbaik yang akan digunakan sebagai data pusat atau *center* pada rancangan *Response Surface Methodology* (RSM). Berikut merupakan grafik pengaruh konsentrasi NaOH (mM) terhadap aktivitas relatif enzim asetilkolinesterase yang terimobilisasi (%).



**Gambar 4.4** Pengaruh Konsentrasi NaOH (mM) Terhadap Aktivitas Relatif Enzim Asetilkolinesterase Terimobilisasi (%)

Berdasarkan **Gambar 4.4** dapat dilihat bahwa terdapat kecenderungan semakin tinggi konsentrasi NaOH maka aktivitas relatif enzim semakin tinggi. Hal ini dikarenakan seiring dengan tingginya konsentrasi NaOH akan menyebabkan pori-pori sol-gel menjadi lebih besar sehingga memudahkan enzim untuk terperangkap masuk ke dalam sol-gel. Hal ini dikarenakan hidrolisis TEOS oleh  $H_2O$  merupakan reaksi substitusi nukleofilik. Pada katalis basa seperti NaOH, gugus hidroksil ( $OH^-$ ) dari NaOH akan menggantikan gugus ethoksi TEOS. Hal tersebut menyebabkan laju hidrolisis semakin cepat seiring dengan semakin cepatnya gugus ethoksi TEOS yang tergantikan. Proses hidrolisis TEOS yang semakin cepat akan menyebabkan ukuran partikel TEOS yang dihasilkan semakin kecil sehingga ukuran pori-pori antar partikel TEOS semakin besar. Ukuran pori-pori matriks yang besar dapat menjadi media yang efektif untuk imobilisasi enzim. Hal ini dikarenakan ukuran pori-pori antar partikel silika yang besar dapat menyebabkan enzim lebih mudah masuk ke dalam matriks serta akses antara substrat dan enzim menjadi lebih mudah berikatan. Selain itu, kelebihan dari ukuran pori antar partikel yang besar dapat menstabilkan konformasi enzim dibandingkan dengan pori-pori yang kecil (Sotiropoulou, 2005).

Pada penelitian pendahuluan tersebut dapat diketahui bahwa aktivitas relatif enzim terimobilisasi yang paling baik terdapat pada konsentrasi NaOH 4 mM sehingga rasio molar tersebut dijadikan nilai *center* dalam rancangan *Response Surface Methodology* (RSM). Sedangkan untuk data minimum yang digunakan untuk faktor konsentrasi NaOH adalah 3 mM dan data maksimum 5 mM.

#### **4.2 Penelitian Utama**

Penelitian utama ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O serta konsentrasi NaOH terhadap jumlah dan aktivitas relatif enzim terimobilisasi. Analisa jumlah enzim serta aktivitas relatif enzim terimobilisasi dilakukan untuk mengetahui efektivitas imobilisasi enzim. Di mana semakin tinggi jumlah dan aktivitas relatif enzim terimobilisasi tersebut maka semakin efektif sol-gel dalam mengimobilisasi enzim asetilkolinesterase dan meningkatkan kualitas biosensor pendeteksi pestisida (Souza *et al.*, 2014). Selain itu, pada penelitian utama dilakukan analisa mengenai uji kualitas biosensor yang meliputi waktu respon, limit deteksi, uji stabilitas terhadap suhu, uji stabilitas terhadap waktu serta uji pada sampel sayuran.

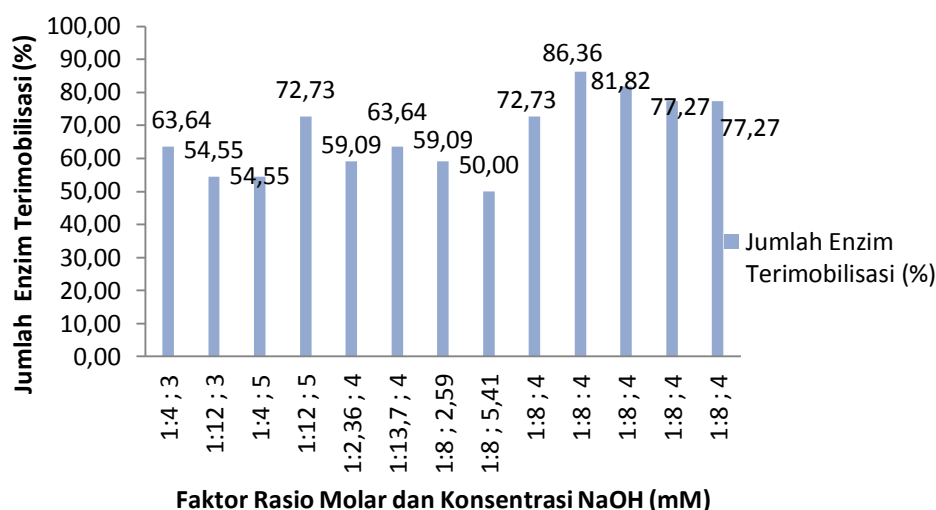
##### **4.2.1 Hasil Analisa Respon**

Formulasi sol-gel merupakan faktor yang sangat penting dalam imobilisasi enzim. Untuk mengoptimalkan formulasi tersebut, maka dilakukan penelitian dengan faktor yang diteliti yaitu rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O serta konsentrasi NaOH sebagai media imobilisasi enzim asetilkolinesterase dilihat dari karakteristik jumlah enzim terimobilisasi (*yield*) serta aktivitas relatif enzim. Berikut merupakan hasil analisa respon rancangan *Response Surface Methodology* (RSM).

**Tabel 4.2** Hasil Analisa Respon Rancangan *Response Surface Methodology*

Std.	Variabel Kode		Respon	
	Faktor 1 Rasio Molar (H <sub>2</sub> O:TEOS)	Faktor 2 Konsentrasi NaOH (mM)	Respon 1 Jumlah Enzim Terimobilisasi (%)	Respon 2 Aktivitas Realtif Enzim Terimobilisasi (%)
1	-1	-1	63,64	54,04
2	1	-1	54,55	52,91
3	-1	1	54,55	52,91
4	1	1	72,73	60,76
5	-1,414	0	59,09	45,07
6	1,414	0	63,64	51,79
7	0	-1,414	59,09	54,04
8	0	1,414	50,00	58,52
9	0	0	72,73	63,00
10	0	0	86,36	74,22
11	0	0	81,82	67,49
12	0	0	77,27	65,25
13	0	0	77,27	61,88

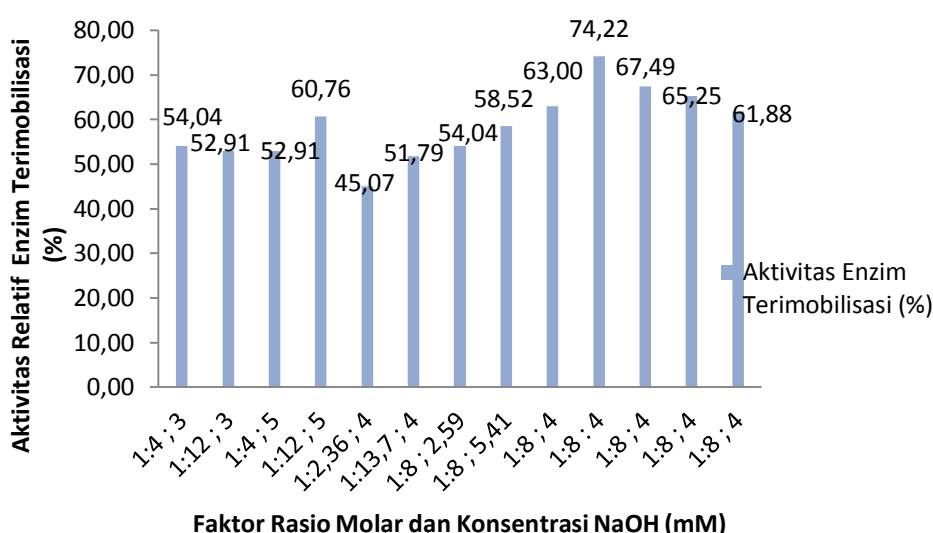
Keterangan: Setiap data yang tercantum merupakan rerata dari dua kali ulangan

**Gambar 4.5** Pengaruh Rasio Molar TEOS:H<sub>2</sub>O dan Konsentrasi NaOH Terhadap Jumlah Enzim Asetilkolinesterase Terimobilisasi (%)

Pada **Tabel 4.2** merupakan tabel yang menjelaskan pengaruh rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O dan konsentrasi NaOH terhadap jumlah enzim asetilkolinesterase terimobilisasi (%). Sedangkan pada **Gambar 4.5** merupakan sajian data dalam bentuk grafik. Pada grafik dengan keterangan 1:8; 4 merupakan data *central* yang berarti rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O adalah 1:8 dan konsentrasi NaOH 4 mM. Data *central* tersebut diulang sebanyak 5 kali dalam 13 rancangan RSM. Data *central* tersebut cenderung menunjukkan hasil yang lebih tinggi daripada rancangan lain. Jumlah enzim asetilkolinesterase terimobilisasi pada

data central berkisar antara 72,73% hingga 86,36%. Jumlah enzim yang terimobilisasi tersebut lebih tinggi jika dibandingkan dengan literatur yaitu penelitian yang dilakukan oleh Lu *et al.* (2009), yang melakukan imobilisasi enzim tripsin pada sol-gel dengan prekursor silika berupa TEOS 0,1 ml; H<sub>2</sub>O deionisasi; PEG 6000 0,1 ml; dan H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M sebanyak 2 $\mu$ l. Hasil jumlah enzim tripsin yang terimobilisasi pada penelitian tersebut berkisar antara 59,9-67,7%. Hal ini mungkin dikarenakan adanya penambahan PEG 6000 yang berfungsi sebagai *stabilizer* sol-gel akan memberikan dampak pada sol-gel yaitu membuat ukuran partikel silika semakin besar karena PEG akan menyelubungi partikel silika tersebut sehingga ukurannya semakin besar (Souza *et al.*, 2014).

Pada Gambar 4.6 merupakan hasil dari pengaruh rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O dan konsentrasi NaOH (mM) terhadap aktivitas relatif enzim asetilkolinesterase (%).



**Gambar 4.6** Pengaruh Rasio Molar TEOS:H<sub>2</sub>O dan Konsentrasi NaOH Terhadap Aktivitas Relatif Enzim Asetilkolinesterase Terimobilisasi (%)

Pada **Gambar 4.6** dengan keterangan 1:8; 4 merupakan data *central* yang berarti rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O adalah 1:8 dan konsentrasi NaOH 4 mM. Data *central* tersebut diulang sebanyak 5 kali dalam 13 rancangan RSM. Data *central* tersebut cenderung menunjukkan hasil yang lebih tinggi daripada rancangan lain. Aktivitas relatif enzim asetilkolinesterase terimobilisasi pada data central berkisar antara 61,88% hingga 74,22%. Pada literatur yaitu Anitha (2004), aktivitas relatif enzim asetilkolinesterase yang diimobilisasi pada sol-gel dengan prekursor etiltrimetoksisilane (ETMS) yaitu 66,90%. Aktivitas relatif enzim tersebut lebih rendah daripada hasil aktivitas relatif



enzim dari data *central* tertinggi yaitu 74,22%. Hal ini dapat dikatakan bahwa enzim asetilkolinesterase lebih baik diimobilisasi pada media sol-gel TEOS daripada ETMS. Hal ini dikarenakan ETMS memiliki rantai yang lebih bercabang dibandingkan dengan TEOS (Sakka, 2005).

Setelah didapatkan data tersebut maka dilakukan pemilihan model yang sesuai untuk menentukan respon optimum didasarkan pada jumlah kuadrat urutan model (*Sequential Model Sum of Squares*), ringkasan model statistik (*Model Summary Statistic*), serta uji ketidaktepatan model statistik (*Lack of Fit Test*).

### **4.3 Hasil Analisa Optimasi Jumlah Enzim Terimobilisasi**

#### **4.3.1. Analisis Pemilihan Model Statistik**

Analisis pemilihan model statistik dilakukan untuk menentukan model yang sesuai dalam menggambarkan signifikansi dari hasil penelitian yang diperoleh. Analisis pemilihan model didasarkan pada uraian jumlah kuadrat (*Sequential Model Sum of Squares*), pengujian ketidaktepatan model (*Lack of Fit Test*) dan ringkasan model statistik (*Summary of Statistic*). Beberapa jenis model yang bisa digunakan dalam program *Design Expert* antara lain: model *linear*, interaksi 2 faktor (2FI), *Quadratic* dan model *Cubic*.

#### **1. Pemilihan Model berdasarkan Jumlah Kuadrat (*Sequential Model Sum of Squares*)**

Pemilihan model berdasarkan jumlah kuadrat didasarkan pada nilai tertinggi derajat polinomial dengan syarat model diterima apabila nilai  $p < 0.05$  (peluang kesalahan dari model adalah kurang dari 5%) yang berarti model berpengaruh nyata terhadap respon. Dari analisis *Sequential Model Sum of Squares* didapatkan model yang dapat dipilih untuk menggambarkan fenomena pengaruh rasio molar dan konsentrasi NaOH terhadap jumlah enzim termobilisasi yang dihasilkan. Pengamatan model bentuk *Quadratic* yang memiliki nilai  $p$  0,0016 (0.16%) yang menunjukkan bahwa peluang kesalahan dari model kurang dari 5% yang berarti model *Quadratic* memiliki pengaruh yang nyata (signifikan) terhadap respon sehingga model *Quadratic* merupakan desain terbaik dan terpilih "*Suggested*" berdasarkan uraian jumlah kuadrat. Dari analisis tersebut didapatkan desain model kuadratik sebagai model terpilih (*Suggested*). Hasil analisa dari pemilihan model berdasarkan jumlah kuadrat ditampilkan pada **Lampiran 5**.

## 2. Pemilihan Model Berdasarkan Pengujian Ketidaktepatan Model

Pemilihan model yang kedua adalah berdasarkan pengujian ketidaktepatan model (*Lack of Fit Test*). Gaspersz (1992) menyatakan bahwa kriteria utama ketepatan model adalah berdasarkan ketidaktepatan model (*lack of fit test*), karena suatu model dianggap tepat jika pada uji ketidaktepatan model bersifat tidak nyata (*not significant*) secara statistik dan dianggap tidak tepat untuk menjelaskan suatu permasalahan dari suatu analisis yang dikaji jika ketidaktepatan model bersifat nyata (*significant*) secara statistik. Berbeda dengan kriteria pemilihan model sebelumnya, kriteria pemilihan model berdasarkan ketidaktepatan model ditentukan dengan nilai  $p > 5\%$ , dimana model diterima jika memiliki nilai  $p > 5\%$  yang berarti ketidaktepatan model bersifat tidak signifikan terhadap respon. Nilai  $p$  pada analisis ketidaktepatan untuk model *Quadratic* menunjukkan hasil sebesar 0,5047 (50,47%) yang berarti ketidaktepatan model *Quadratic* tersebut berpengaruh tidak nyata terhadap respon, sehingga model *Quadratic* diterima (*suggested*). Perhitungan hasil pemilihan model berdasarkan pengujian ketidaktepatan model disajikan pada **Lampiran 5**.

## 3. Pemilihan Model Berdasarkan Ringkasan Model Statistik

Pemilihan model ketiga adalah berdasarkan analisis ringkasan model statistik (*model summary statistic*), yaitu analisa perhitungan kesimpulan dari perhitungan sebelumnya. Menurut Montgomery (2001), penentuan model yang terbaik difokuskan pada nilai adjusted  $R^2$  dan Predicted  $R^2$  yang maksimal. Pemilihan model juga difokuskan pada nilai PRESS (*Prediction Error Sum of Squares*) yang paling minimal (Draper and Smith, 1998).

Parameter statistik yang digunakan untuk memilih model yang tepat adalah model yang memiliki standar deviasi dan PRESS yang terendah. Standar deviasi dan PRESS yang rendah menunjukkan bahwa tingkat keragaman dan prediksi kesalahan jumlah kuadrat rendah. Berdasarkan perhitungan, standar deviasi terendah dimiliki oleh model *Quadratic*. Model *quadratic* memiliki standar deviasi 4,967 dan PRESS sebesar 663,090 yang membuat model ini berstatus *Suggested* (disarankan untuk dipilih).

Model *quadratic* memiliki nilai  $R^2$  sebesar 0,872 yang menunjukkan bahwa faktor konsentrasi rasio molar dan konsentrasi NaOH pada penelitian memberikan pengaruh sebesar 87,2% pada keragaman respon jumlah enzim termobilisasi sedangkan sisanya sebesar 12,8% dipengaruhi faktor lain yang tidak dimasukkan dalam model. Nilai Adjusted  $R^2$  sebesar 0,781 yang berarti

keeratan hubungan antara rasio molar dan konsentrasi NaOH terhadap respon jumlah enzim termobilisasi sebesar 78,1%. Analisis model berdasarkan ringkasan model statistik secara lengkap disajikan pada **Lampiran 5**.

#### **4.3.2 Analisis Ragam (ANOVA) dari RSM pada Respon Jumlah Enzim Terimobilisasi**

Setelah didapatkan model terpilih yaitu model *Quadratic*, maka dilakukan analisa ragam (ANOVA) digunakan untuk menganalisa tingkat keakuratan model terpilih berdasarkan nilai analisa ragam terhadap model dan nilai *Lack of Fit*. Selain itu, analisa ragam ini juga dapat menjelaskan hubungan antara variabel  $X_1$  (rasio molar TEOS dan  $H_2O$ ) dan  $X_2$  (konsentrasi NaOH) terhadap respon  $Y_1$  (jumlah enzim termobilisasi) disajikan pada **Tabel 4.3**.

Menurut Montgomery (2009), model dinyatakan signifikan atau berpengaruh nyata terhadap respon apabila nilai P kurang dari 0,05 (5%). Pada penelitian ini, analisa ragam model ditunjukkan dengan nilai P 0,0038 sehingga model dinyatakan signifikan. Sedangkan untuk nilai *Lack of fit* atau ketidaktepatan pengujian dinyatakan tidak signifikan apabila nilai P lebih besar dari 0,05. Pada **Tabel 4.3**, nilai *Lack of Fit* yang ditunjukkan yaitu 0,4633. Sehingga berdasarkan nilai analisa ragam model dan *Lack of Fit* tersebut menunjukkan bahwa model *Quadratic* sesuai dengan seluruh nilai rancangan.

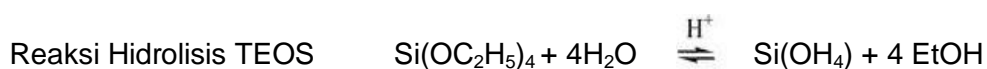
Interaksi antara Rasio molar TEOS dan  $H_2O$  (kuadrat) dan Konsentrasi NaOH berpengaruh positif dan signifikan terhadap jumlah enzim termobilisasi, sehingga dapat dinyatakan apabila interaksi antara Rasio molar (kuadrat) dan konsentrasi NaOH meningkat maka jumlah enzim termobilisasi akan semakin banyak. Rasio molar TEOS dan  $H_2O$  (kuadrat) pada **Tabel 4.5** menunjukkan pengaruh yang positif dan signifikan terhadap respon yang diperoleh. Hal tersebut terjadi karena semakin besar rasio molar yang diberikan, jumlah enzim termobilisasi juga semakin meningkat sampai batas rasio tertentu dan akan menurun seiring dengan bertambahnya rasio.

**Tabel 4.3** Hasil analisis ragam (ANOVA) dari model *quadratic*

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	Db	Mean Kuadrat	Nilai F	Nilai P Prob>F	Keterangan
Model	1426,15	5	285,23	10,410	0.0038	significant
A	30,11	1	30,11	1,100	0.3294	not significant
B	1,77	1	1,77	0,065	0.8065	not significant
AB	185,95	1	185,95	6,790	0.0352	significant
A <sup>2</sup>	446,48	1	446,48	16,300	0.0050	significant
B <sup>2</sup>	907,32	1	907,32	28,110	0.0007	significant
Residual	191,78	7	27,40			
Lack of Fit	84,34	3	28,11	1,05	0.4633	not significant
Pure Error	107,44	4	26,86			
Cor Total	1617,93	12				
Keterangan: A = Variabel X <sub>1</sub> (rasio molar TEOS dan H <sub>2</sub> O)) B = Variabel X <sub>2</sub> (konsentrasi NaOH (mM)) AB, A <sup>2</sup> , B <sup>2</sup> = interaksi antar perlakuan						

Hal ini juga sesuai dengan literatur yaitu Altstein *et al.* (1998), yang meneliti pengaruh rasio molar terhadap aktivitas relatif enzim. Pada penelitian tersebut menjelaskan bahwa rasio molar 1:4,1:6,1:8,1:10,1:12,1:14, dan 1:16 terdapat kecenderungan terjadi peningkatan jumlah enzim asetilkolinesterase terimobilisasi seiring meningkatnya rasio molar sampai 1:10 kemudian diikuti oleh penurunan pada rasio molar 1:12, 1:14, dan 1:16. Pada proses pembentukan TEOS atau silika pada sol-gel H<sub>2</sub>O berperan sebagai agen - *cross-linking* atau molekul yang membentuk cabang atau ikatan silang pada sol-gel. Sehingga semakin banyak H<sub>2</sub>O yang digunakan pada formulasi sol-gel maka semakin banyak cabang yang terbentuk. Hal ini menyebabkan enzim menjadi terbatas untuk masuk ke dalam matriks sol-gel tersebut (Sakka, 2005).

Selain itu, penurunan jumlah enzim terimobilisasi tersebut dikaitkan dengan semakin tinggi jumlah ethanol sebagai produk yang dilepaskan pada saat reaksi hidrolisis sol-gel. Tingginya konsentrasi ethanol berbanding lurus dengan konsentrasi H<sub>2</sub>O yang ada di dalam formulasi sol-gel. Menurut Shin *et al.* (2001), ethanol dapat mengganggu struktur air pada daerah hidrofobik enzim asetilkolinesterase. Hal tersebut menyebabkan ketidakstabilan konformasi enzim sehingga dapat menurunkan aktivitas relatif enzim asetilkolinesterase tersebut.

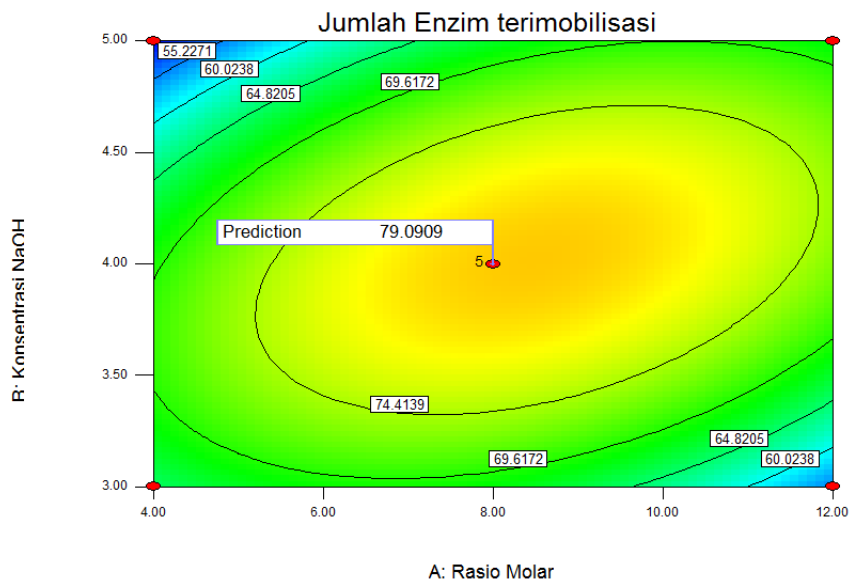


Konsentrasi NaOH (kuadrat) pada **Tabel 4.3** juga menunjukkan pengaruh yang positif dan signifikan terhadap respon yang diperoleh. Hasil tersebut bermakna bahwa penambahan konsentrasi NaOH akan meningkatkan jumlah enzim termobilisasi sampai pada batas tertentu, dan apabila dilakukan penambahan kembali maka respon jumlah enzim termobilisasi justru akan menurun. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Vamavakaki *et al.* (2005), menjelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi NaOH maka menyebabkan pori-pori sol-gel semakin besar. Hal ini berkaitan dengan gugus hidroksil pada NaOH akan mempercepat pergantian gugus ethoksi pada TEOS dalam reaksi hidrolisis. Semakin cepat reaksi hidrolisis TEOS, maka ukuran partikel yang dihasilkan menjadi kecil. Akibat dari ukuran partikel TEOS yang kecil menyebabkan pori sol-gel semakin besar dan jumlah enzim yang terperangkap akan semakin banyak. Berdasarkan pernyataan tersebut dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi antara konsentrasi NaOH dengan jumlah enzim yang terperangkap.

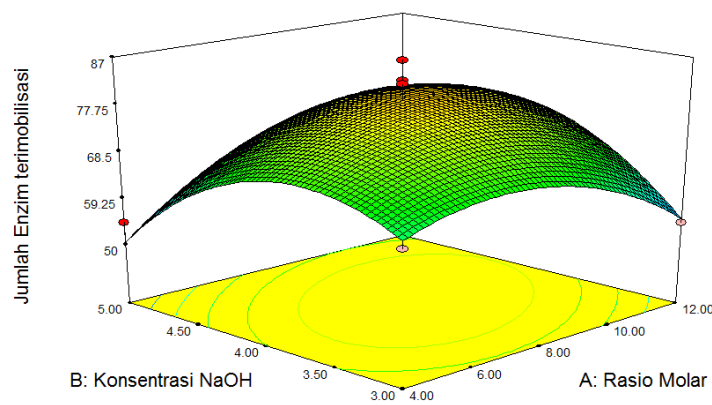
#### **4.3.3. Pengaruh Rasio Molar dan Konsentrasi NaOH terhadap Respon Jumlah Enzim Termobilisasi**

Grafik respon digunakan untuk mempermudah gambaran dalam mengetahui pengaruh variabel terhadap respon enzim termobilisasi. Respon enzim termobilisasi digambarkan dalam kurva 3 dimensi dan kontur plot. Kontur plot adalah plot 2 dimensi yang merupakan irisan melintang kurva 3 dimensi. Kontur plot berguna untuk menganalisa efek interaksi antar faktor pada respon (Hasan *et al.* 2009).

**Gambar 4.7** menggambarkan kurva 3 dimensi dan kontur plot untuk optimasi media sol-gel untuk imobilisasi enzim asetilkolinesterase. Gambar menggambarkan efek dari dua parameter pada jumlah enzim termobilisasi. Nilai-nilai yang tertera pada kotak yang ada di kontur plot mengindikasikan jumlah enzim termobilisasi pada berbagai kondisi proses optimasi yang dikaji. **Gambar 4.7** memperlihatkan bahwa bentuk kurva *saddle shape* yang menggambarkan kemungkinan dari variabel pada poin maksimum dan minimum. Sistem kontur yang demikian disebut *saddle* atau *minimax system*.



**Gambar 4.7 (a)** Kontur Plot



**Gambar 4.7 (b)** kurva permukaan respon (3 dimensi) Rasio Molar dan Konsentrasi NaOH terhadap Respon Jumlah Enzim Termobilisasi

Sumbu x dan sumbu y pada **Gambar 4.7 (a)** menunjukkan variabel yang dioptimasi. Sumbu x menunjukkan variabel rasio molar TEOS dan  $H_2O$ , sedangkan sumbu y menunjukkan variabel konsentrasi NaOH. Garis-garis melingkar menunjukkan respon. Respon optimal ditandai dengan adanya bendera (*flag*) yang berada di tengah kontur yang menunjukkan keterangan titik optimal yang terletak pada titik (*node*) yang ditunjukkan pada bendera tersebut. Pada kontur plot, jumlah enzim termobilisasi optimum ditunjukkan pada titik (*node*) sebesar 79,0909%.

#### 4.3.4. Penentuan Kondisi Optimum Respon Jumlah Enzim Terimobilisasi

*Software Design Expert 7.1.5* digunakan untuk mengidentifikasi kombinasi terbaik dari parameter formulasi sol-gel yang digunakan untuk mengoptimasi jumlah enzim terimobilisasi dan aktivitas relatif enzim terimobilisasi. *Desirability* merupakan suatu metode yang digunakan untuk menjelaskan seberapa baik solusi optimal yang ditawarkan agar sesuai dengan tujuan dari respon (Laluce *et al.* 2009). Nilai *desirability* 1 mengindikasikan *the perfect case*, tetapi nilai *desirability* 0 mengindikasikan respon harus dibuang (Laluce *et al.* 2009). Pada penelitian ini, solusi optimal yang ditawarkan oleh model adalah rasio molar sebesar 1:8,58 (TEOS:H<sub>2</sub>O) dan konsentrasi NaOH sebesar 4,09 (mM) untuk prediksi respon sebesar 79,155%, dengan nilai *desirability* 0,77. Titik optimum masing-masing variabel merupakan titik stasioner yang diduga merupakan respon optimum.

Berdasarkan pengolahan data menggunakan *Design Expert 7.1.5*, persamaan model regresi kuadratik terbentuk dari variabel  $X_1$ , dan  $X_2$  yang dibangun dari model terpilih dalam bentuk persamaan kode yaitu :

$$Y_1 = 81,67 + 3,53X_1 - 0,55X_2 + 6,48X_1X_2 - 5,71X_1^2 - 10,57X_2^2$$

Variabel aktual dijumpai juga pada program *Design Expert*. Bentuk persamaannya disebut persamaan aktual, yaitu:

$$Y_1 = -63,245 + 0,106X_1 + 71,026X_2 + 1,620X_1X_2 - 0,357X_1^2 - 10,567X_2^2$$

Persamaan tersebut merupakan model terbaik untuk menerangkan hubungan antara respon dengan variabel bebas yang diberikan (rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O dan konsentrasi NaOH). Berdasarkan persamaan variabel aktual tersebut dapat disimpulkan bahwa rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O ( $X_1$ ) dan konsentrasi NaOH ( $X_2$ ) berpengaruh pada aktivitas relatif enzim. Hal ini dapat dilihat dari kedua faktor ( $X_1$  dan  $X_2$ ) tersebut memiliki tanda positif dalam persamaan variabel aktual.

#### 4.4 Hasil Analisa Optimasi Aktivitas Relatif Enzim

##### 4.4.1 Analisis Pemilihan Model Statistik

Analisis pemilihan model statistik dilakukan untuk menentukan model yang sesuai dalam menggambarkan signifikansi dari hasil penelitian yang diperoleh. Analisis pemilihan model didasarkan pada uraian jumlah kuadrat (*Sequential Model Sum of Squares*), pengujian ketidaktepatan model (*Lack of Fit Test*) dan ringkasan model statistik (*Summary of Statistic*). Beberapa jenis model yang bisa digunakan dalam program *Design Expert* antara lain: model *linear*, interaksi 2 faktor (2FI), *Quadratic* dan model *Cubic*.

## 1. Pemilihan Model berdasarkan Jumlah Kuadrat (*Sequential Model Sum of Squares*)

Pemilihan model berdasarkan jumlah kuadrat didasarkan pada nilai tertinggi derajat polinomial dengan syarat model diterima apabila nilai  $p < 0.05$  (peluang kesalahan dari model adalah kurang dari 5%) yang berarti model berpengaruh nyata terhadap respon. Dari analisis *Sequential Model Sum of Squares* didapatkan model yang dapat dipilih untuk menggambarkan fenomena pengaruh rasio molar TEOS dan  $H_2O$  dan konsentrasi NaOH terhadap aktivitas relatif enzim yang dihasilkan. Pengamatan model selanjutnya adalah bentuk *Quadratic* yang memiliki nilai  $p = 0,0214$  (2,14%) yang menunjukkan bahwa peluang kesalahan dari model kurang dari 5% yang berarti model *Quadratic* memiliki pengaruh yang nyata (signifikan) terhadap respon sehingga model *Quadratic* merupakan desain terbaik dan terpilih “*Suggested*” berdasarkan uraian jumlah kuadrat. Hasil analisa model berdasarkan jumlah kuadrat ditampilkan pada **Lampiran 6**.

## 2. Pemilihan Model Berdasarkan Pengujian Ketidaktepatan Model

Pemilihan model yang kedua adalah berdasarkan pengujian ketidaktepatan model (*Lack of Fit Test*). Gaspersz (1992) menyatakan bahwa kriteria utama ketepatan model adalah berdasarkan ketidaktepatan model (*lack of fit test*), karena suatu model dianggap tepat jika pada uji ketidaktepatan model bersifat tidak nyata (*not significant*) secara statistik dan dianggap tidak tepat untuk menjelaskan suatu permasalahan dari suatu analisis yang dikaji jika ketidaktepatan model bersifat nyata (*significant*) secara statistik. Berbeda dengan kriteria pemilihan model sebelumnya, kriteria pemilihan model berdasarkan ketidaktepatan model ditentukan dengan nilai  $p > 5\%$ , dimana model diterima jika memiliki nilai  $p > 5\%$  yang berarti ketidaktepatan model bersifat tidak signifikan terhadap respon. Nilai  $p$  pada analisis ketidaktepatan model pada untuk model *Quadratic* menunjukkan hasil sebesar 0,0750 (7,50%) yang berarti ketidaktepatan model *Quadratic* tersebut berpengaruh tidak nyata terhadap respon, sehingga model *Quadratic* diterima (*suggested*). Perhitungan hasil pemilihan model berdasarkan pengujian ketidaktepatan model disajikan pada **Lampiran 6**.



### 3. Pemilihan Model Berdasarkan Ringkasan Model Statistik

Pemilihan model ketiga adalah berdasarkan analisis ringkasan model statistik (*model summary statistic*), yaitu analisa perhitungan kesimpulan dari perhitungan sebelumnya. Menurut Montgomery (2001), penentuan model yang terbaik difokuskan pada nilai adjusted  $R^2$  dan Predicted  $R^2$  yang maksimal. Pemilihan model juga difokuskan pada nilai PRESS (*Prediction Error Sum of Squares*) yang paling minimal (Draper and Smith, 1998). Analisis model berdasarkan ringkasan model statistik secara lengkap disajikan pada **Lampiran 6**.

Parameter statistik yang digunakan untuk memilih model yang tepat adalah model yang memiliki standar deviasi dan PRESS yang terendah. Standar deviasi dan PRESS yang rendah menunjukkan bahwa tingkat keragaman dan prediksi kesalahan jumlah kuadrat rendah. Berdasarkan hasil, dapat diketahui bahwa standar deviasi terendah dimiliki oleh model *Quadratic*. Model *quadratic* memiliki standar deviasi 8,091 dan PRESS sebesar 2731,04 yang membuat model ini berstatus *Suggested* (disarankan untuk dipilih).

Model *quadratic* memiliki nilai  $R^2$  sebesar 0,719 yang menunjukkan bahwa faktor konsentrasi rasio molar TEOS dan  $H_2O$  dan konsentrasi NaOH pada penelitian memberikan pengaruh sebesar 71,9% pada keragaman respon aktivitas relatif enzim sedangkan sisanya sebesar 28,1% dipengaruhi faktor lain yang tidak dimasukkan dalam model. Nilai Adjusted  $R^2$  sebesar 0,518 yang berarti keeratan hubungan antara rasio molar TEOS dan  $H_2O$  dan konsentrasi NaOH terhadap respon aktivitas relatif enzim sebesar 51,8%.

#### 4.4.2 Analisis Ragam (ANOVA) dari RSM pada Respon Aktivitas Relatif Enzim

Dari hasil ketiga proses pemilihan model, maka terpilihlah model *Quadratic* sebagai model yang digunakan untuk menjelaskan hubungan antara variabel  $X_1$  (rasio molar TEOS dan  $H_2O$ ) dan  $X_2$  (konsentrasi NaOH) terhadap respon  $Y_2$  (aktivitas relatif enzim). Setelah terpilih model, maka dilakukan analisis ragam terhadap model *Quadratic* tersebut yang bertujuan untuk mengetahui signifikansi model tersebut dilihat dari nilai analisa ragam model serta nilai *Lack of Fit*. Hasil dari analisis ragam untuk respon  $Y_2$  (aktivitas relatif enzim) dengan model *Quadratic* secara lengkap disajikan pada **Tabel 4.4**.

**Tabel 4.4.** Hasil analisis ragam (ANOVA) dari model *quadratic*

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	db	Mean Kuadrat	Nilai F	Nilai P Prob>F	Keterangan
Model	625,44	5	125,09	7,80	0.0088	<i>significant</i>
A	32,96	1	32,96	2,06	0.1947	<i>not significant</i>
B	21,35	1	21,35	1,33	0.2864	<i>not significant</i>
AB	20,11	1	20,11	1,25	0.2997	<i>not significant</i>
A <sup>2</sup>	475,54	1	475,54	29,66	0.0010	<i>significant</i>
B <sup>2</sup>	131,28	1	131,28	7,811	0.0267	<i>significant</i>
Residual	112,22	7	16,03			
Lack of Fit	16,70	3	5,57	0,23	0.8693	<i>not significant</i>
Pure Error	95,52	4	23,88			
Cor Total	737,65	12				
Keterangan: A = Variabel X <sub>1</sub> (rasio molar TEOS:H <sub>2</sub> O)) B = Variabel X <sub>2</sub> (konsentrasi NaOH (mM)) AB, A <sup>2</sup> , B <sup>2</sup> = interaksi antar perlakuan						

Berdasarkan analisis ragam (ANOVA) yang disajikan pada **Tabel 4.4**, menunjukkan bahwa model signifikan atau berpengaruh nyata terhadap respon dimana nilai P kurang dari 0.05 (5%). *Lack of fit* atau ketidaktepatan pengujian tidak signifikan sebesar 0,8693 menunjukkan bahwa model sesuai dengan seluruh nilai rancangan. Hal ini dikarenakan nilai P lebih besar dari 0.05. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O (kuadrat) dan konsentrasi NaOH (kuadrat) berpengaruh nyata (signifikan) terhadap respon.

Rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O (kuadrat) pada **Tabel 4.4** menunjukkan pengaruh yang positif dan signifikan terhadap respon yang diperoleh. Hal tersebut terjadi karena semakin besar rasio molar yang diberikan, aktivitas relatif enzim juga semakin meningkat sampai batas rasio tertentu dan akan menurun seiring dengan bertambahnya rasio. Konsentrasi NaOH (kuadrat) pada **Tabel 4.4** juga menunjukkan pengaruh yang positif dan signifikan terhadap respon yang diperoleh. Hasil tersebut bermakna bahwa penambahan konsentrasi NaOH akan meningkatkan aktivitas relatif enzim sampai pada batas tertentu, dan apabila dilakukan penambahan kembali maka respon aktivitas relatif enzim justru akan menurun.

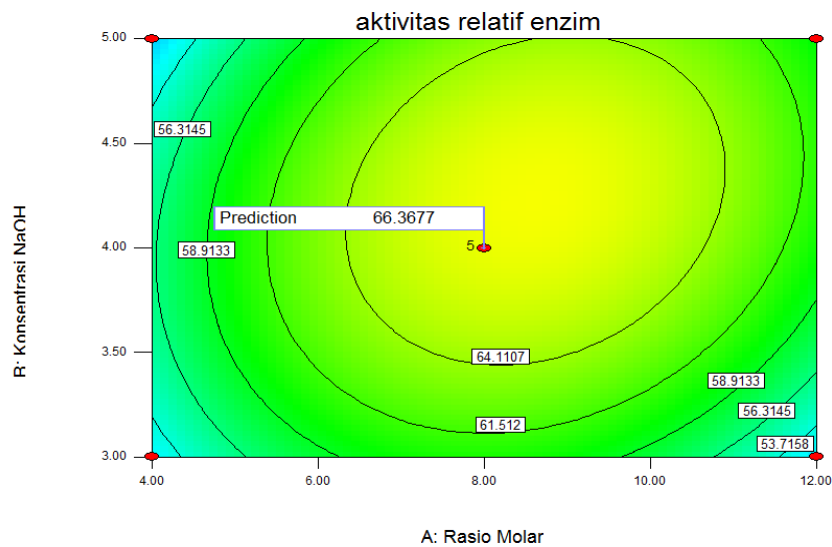
Hal tersebut juga sesuai dengan literatur, di mana terdapat korelasi yang kuat antara rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O dengan NaOH di mana rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O memberikan pengaruh semakin banyak jumlah H<sub>2</sub>O yang digunakan maka semakin banyak cabang yang terbentuk pada struktur sol-gel sedangkan NaOH akan memberikan pengaruh untuk mempercepat reaksi pergantian gugus ethoksi saat hidrolisis TEOS sehingga ukuran partikel TEOS

yang terbentuk menjadi lebih kecil. Kombinasi dari kedua faktor tersebut menyebabkan pori-pori antar partikel TEOS dalam sol-gel semakin besar (Dingsoyr dan Christy, 2000). Pori-pori sol-gel yang besar akan membuat enzim semakin mudah untuk terperangkap (Sotiropolou *et al.*, 2005) serta dapat mempertahankan aktivitas enzim karena pori-pori yang besar memiliki peran untuk mencegah enzim dari perubahan konformasi (Vamavakiki *et al.*, 2005).

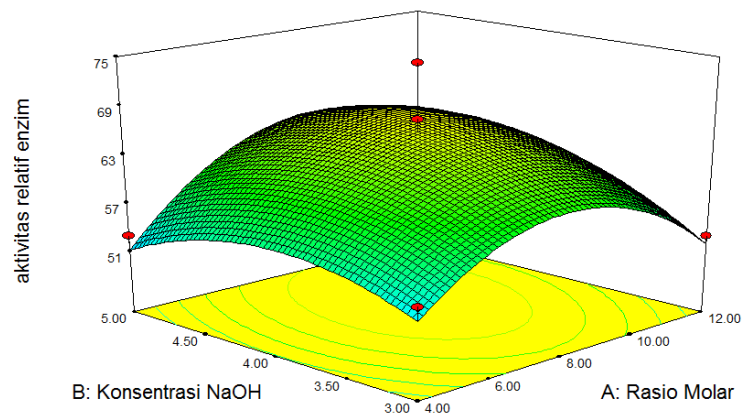
#### **4.4.3. Pengaruh Rasio Molar dan Konsentrasi NaOH terhadap Respon Aktivitas Relatif Enzim**

Grafik respon digunakan untuk mempermudah gambaran dalam mengetahui pengaruh variabel terhadap respon aktivitas relatif enzim. Respon aktivitas relatif enzim digambarkan dalam kurva 3 dimensi dan kontur plot. Kontur plot adalah plot 2 dimensi yang merupakan irisan melintang kurva 3 dimensi. Kontur plot berguna untuk menganalisa efek interaksi antar faktor pada respon (Hasan *et al.* 2009).

**Gambar 4.8** menggambarkan kurva 3 dimensi dan kontur plot untuk optimasi media sol-gel untuk imobilisasi enzim asetilkonolinesterase. Gambar menggambarkan efek dari dua parameter pada aktivitas relatif enzim. Nilai-nilai yang tertera pada kotak yang ada di kontur plot mengindikasikan aktivitas relatif enzim pada berbagai kondisi proses optimasi yang dikaji. Gambar tersebut memperlihatkan bahwa bentuk kurva *saddle shape* yang menggambarkan kemungkinan dari variabel pada poin maksimum dan minimum. Sistem kontur yang demikian disebut *saddle* atau *minimax system*.



**Gambar 4.8 (a)** Kontur plot



**Gambar 4.8 (b)** kurva permukaan respon (3 dimensi) Rasio Molar dan Konsentrasi NaOH terhadap Respon Aktivitas relatif enzim

Sumbu x dan sumbu y pada **Gambar 4.8 (a)** menunjukkan variabel yang dioptimasi. Sumbu x menunjukkan variabel rasio molar, sedangkan sumbu y menunjukkan variabel konsentrasi NaOH. Garis-garis melingkar menunjukkan respon. Respon optimal ditandai dengan adanya bendera (*flag*) yang berada di tengah kontur yang menunjukkan keterangan titik optimal yang terletak pada titik (*node*) yang ditunjukkan pada bendera tersebut. Pada kontur plot, aktivitas relatif enzim optimum ditunjukkan pada titik (*node*) sebesar 66,3677%.

#### 4.4.4. Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Relatif Enzim

*Software Design Expert 7.1.5* digunakan untuk mengidentifikasi kombinasi terbaik dari parameter formulasi sol-gel yang digunakan untuk mengoptimasi

jumlah enzim terimobilisasi dan aktivitas enzim terimobilisasi.. *Desirability* merupakan suatu alat yang digunakan untuk menjelaskan seberapa baik solusi optimal yang ditawarkan agar sesuai dengan tujuan dari respon (Laluce *et al.* 2009). Nilai *desirability* 1 mengindikasikan *the perfect case*, tetapi nilai *desirability* 0 mengindikasikan respon harus dibuang (Laluce *et al.* 2009). Pada penelitian ini, solusi optimal yang ditawarkan oleh model adalah rasio molar sebesar 1 : 8,58 (TEOS:H<sub>2</sub>O) dan konsentrasi NaOH sebesar 4,09 (mM) untuk prediksi respon sebesar 66,6317%, dengan nilai *desirability* 0,77. Titik optimum masing-masing variabel merupakan titik stasioner yang diduga merupakan respon optimum.

Berdasarkan pengolahan data menggunakan *Design Expert 7.1.5*, persamaan model regresi kuadratik terbentuk dari variabel  $X_1$ , dan  $X_2$  yang dibangun dari model terpilih dalam bentuk persamaan kode yaitu :

$$Y_2 = 75,51 + 3,80X_1 - 2,78X_2 + 4,42X_1X_2 - 8,69X_1^2 - 8,57X_2^2$$

Variabel aktual dijumpai juga pada program *Design Expert*. Bentuk persamaannya disebut persamaan aktual, yaitu:

$$Y_2 = -57,539 + 5,218X_1 + 56,964X_2 + 1,106X_1X_2 - 0,543X_1^2 - 8,574X_2^2$$

Persamaan tersebut merupakan model terbaik untuk menerangkan hubungan antara respon dengan variabel bebas yang diberikan (rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O dan konsentrasi NaOH). Berdasarkan persamaan variabel aktual tersebut dapat disimpulkan bahwa rasio molar TEOS dan H<sub>2</sub>O ( $X_1$ ) dan konsentrasi NaOH ( $X_2$ ) berpengaruh pada aktivitas relatif enzim. Hal ini dapat dilihat dari kedua faktor tersebut memiliki tanda positif dalam persamaan variabel aktual.

#### 4.5 Verifikasi Hasil Optimasi

Verifikasi hasil optimasi perlu dilakukan untuk membuktikan hasil prediksi dan nilai respon solusi formula optimum yang disarankan oleh program *Design Expert*. Verifikasi dilakukan dengan cara membandingkan nilai analisa respon pada penelitian dengan nilai respon hasil perhitungan *software Design Expert*. Hasil verifikasi dan prediksi ditunjukkan pada **Tabel 4.6**.

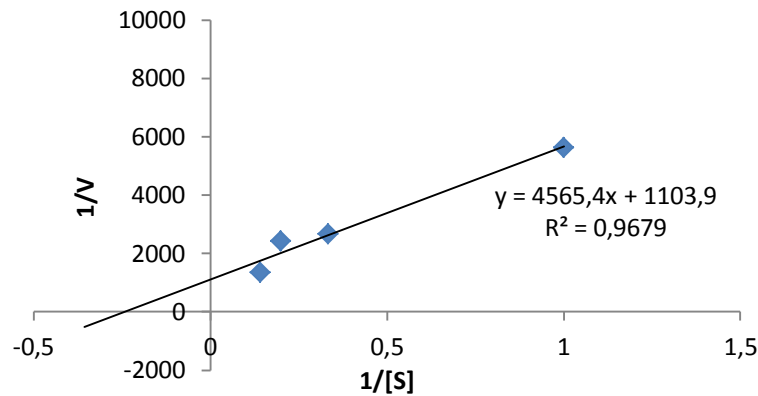
**Tabel 4.6** Perbandingan Hasil Verifikasi dengan Prediksi

	Faktor		Respon	
	Rasio Molar TEOS:H <sub>2</sub> O	Konsentrasi NaOH (mM)	Jumlah Enzim Terimobilisasi (%)	AKtivitas Enzim Terimobilisasi (%)
Prediksi	1:8,58	4,09	79,15	66,63
Verifikasi	1:8,58	4,09	84,09 ± 3,21	70,45 ± 3,81
95% PI low	1:8,58	4,09	65,61	56,27
95% PI high	1:8,58	4,09	92,70	76,99

Selain memberikan prediksi nilai respon, program *Design Expert* juga memberikan *prediction interval* (PI). PI merupakan rentang yang menunjukkan hasil pengukuran respon berikutnya dengan kondisi sama pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan data, diperoleh perbandingan hasil prediksi program *Design Expert* dengan perhitungan aktual pada seluruh respon menunjukkan bahwa nilai verifikasi sudah sesuai dengan nilai prediksi, dikarenakan respon yang didapat masih berkisar pada rentang PI. Hal ini didukung oleh Wu *et al.* (2002), yang menyatakan bahwa perbedaan nilai prediksi dan hasil penelitian yang tidak lebih dari 5% mengindikasikan bahwa model tersebut cukup tepat dan selisih nilai tidak terlalu signifikan, dengan demikian solusi variabel bebas yang diberikan dapat diterima.

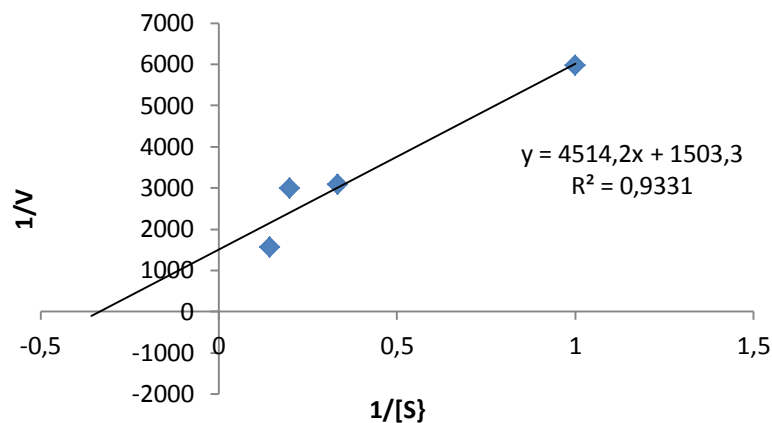
#### 4.6 Sifat Katalis Enzim Bebas dan Enzim Terimobilisasi

Penentuan nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$  dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada beberapa konsentrasi substrat yaitu *indoxyl acetate* 1, 3, 5, dan 7 mg/ml sehingga dapat diketahui pengaruh penambahan substrat terhadap aktivitas enzim. Setelah didapatkan nilai  $V_0$  kemudian dilakukan plot kurva Lineweaver-Burk dengan sumbu x adalah  $1/[S]$  atau  $1/\text{konsentrasi substrat}$ , sedangkan sumbu y adalah  $1/V_0$  atau  $1/\text{kecepatan awal reaksi}$ . Berdasarkan kurva Lineweaver-Burk untuk didapatkan persamaan  $y = ax + b$  dimana persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$ . Untuk menghitung nilai  $K_m$  didapatkan dari hasil pembagian nilai a dengan b pada persamaan sedangkan untuk menghitung nilai  $V_{max}$  didapatkan dari nilai  $1/b$  pada persamaan regresi Lineweaver-burk. Berikut merupakan kurva Lineweaver-Burk dari enzim asetilkolinesterase bebas (tidak diimobilisasi).



**Gambar 4.9** Kurva Lineweaver-Burk Aktivitas Enzim Asetilkolinesterase Bebas

Berdasarkan gambar tersebut dapat dilihat bahwa persamaan linear dari enzim asetilkolinesterase bebas yaitu  $y = 4565,4 + 1103,9$ . Sehingga dapat ditentukan nilai  $k_m$  adalah  $4,136 \mu\text{mol/ml}$  sedangkan nilai  $V_{\max}$  adalah  $0,000906 \mu\text{mol/ml}$ .



**Gambar 4.10** Kurva Lineweaver-Burk Aktivitas Enzim Asetilkolinesterase Terimobilisasi

Berdasarkan gambar tersebut dapat dilihat bahwa persamaan linear dari enzim asetilkolinesterase terimobilisasi yaitu  $y = 4514,2 + 1503,3$ . Sehingga dapat ditentukan nilai  $k_m$  adalah  $3,0029 \mu\text{mol/ml}$  sedangkan nilai  $V_{\max}$  adalah  $0,000665 \mu\text{mol/ml}$ . Terjadinya penurunan nilai  $k_m$  dan  $V_{\max}$  pada enzim terimobilisasi ini mengindikasikan terjadinya peningkatan afinitas enzim terhadap substratnya sehingga dapat dikatakan imobilisasi enzim dengan media sol-gel hasil optimasi dapat mempertahankan bahkan meningkatkan sifat katalitik enzim asetilkolinesterase. Hal ini dikarenakan matriks sol-gel dapat melindungi enzim dari denaturasi akibat perubahan lingkungan seperti suhu dan pH sehingga enzim yang diimobilisasi menjadi lebih stabil (Guzik ,

2014). Menurut Koga *et al.* (1999), nilai  $K_m$  menunjukkan konstanta disosiasi kompleks enzim-substrat, sehingga semakin rendah nilai  $k_m$  maka semakin kuat afinitasnya terhadap substrat. Sedangkan menurut literatur, enzim asetilkolinesterase bebas memiliki nilai  $k_m$  dan  $V_{max}$  sebesar 6,35  $\mu\text{mol/ml}$  dan 50  $\mu\text{mol/ml}$ . Setelah dilakukan imobilisasi menggunakan media Ca-alginat nilai  $k_m$  dan  $V_{max}$  enzim tersebut menjadi 8,68  $\mu\text{mol/ml}$  dan 12,7  $\mu\text{mol/ml}$ . Kenaikan nilai  $k_m$  dan  $V_{max}$  ini dikarenakan saat enzim terimobilisasi, maka afinitas enzim menjadi berkurang terhadap substratnya (Sahin *et al.*, 2005).

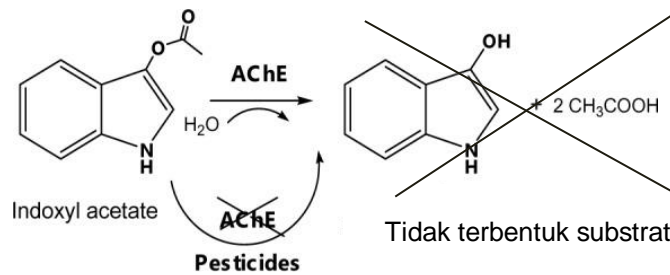
#### 4.7 Prinsip Kerja Biosensor

Prinsip kerja dari biosensor ini adalah mendeteksi keberadaan residu pestisida organofosfat jenis profenofos pada sampel. Apabila terdapat residu pestisida (reaksi positif) maka ditandai dengan adanya perubahan intensitas warna biru yang lebih pudar pada zona reaksi biosensor setelah waktu inkubasi selama 20 menit. Sedangkan, apabila tidak terdapat residu pestisida (reaksi negatif) maka tidak terdapat perubahan warna pada zona reaksi.

Zona reaksi biosensor awalnya berwarna biru indigo. Warna ini dihasilkan reaksi enzimatik dari enzim asetilkolinesterase yang bertemu dengan substrat kromogenik yaitu *indoxyl acetate*. Produk yang terbentuk dari hasil reaksi enzimatik tersebut adalah *indoxyl* dan asam asetat. Selanjutnya *indoxyl* akan mengalami oksidasi sehingga memiliki sifat *fluorescent* dua kali lipat lebih tinggi daripada sebelumnya, hal tersebut menyebabkan *indoxyl* berubah warna menjadi biru indigo (Guilbault dan Kramer, 1965).

Sedangkan apabila terdapat residu pestisida, maka pada zona reaksi akan mengalami perubahan intensitas warna biru menjadi lebih pudar. Hal ini dikarenakan pestisida merupakan inhibitor kompetitif dari enzim asetilkolinesterase, yaitu inhibitor menyerupai molekul substrat yang normal dan bersaing agar dapat terikat pada sisi aktif enzim, yaitu pada gugus serin. Residu pestisida akan melakukan fosforilasi atau pengikatan gugus fosfat pada sisi aktif enzim yang menyebabkan perubahan sisi aktif enzim tersebut (Apilux *et al.*, 2015). Hal tersebut mengakibatkan enzim asetilkolinesterase (AChE) menjadi berkurang kemampuannya untuk menghidrolisis substrat *indoxyl acetate* sehingga terjadi perubahan intensitas warna biru menjadi lebih pudar pada zona reaksi biosensor.





**Gambar 4.11** Mekanisme penghambatan enzim asetilkolinesterase oleh pestisida (Apilux *et al.*, 2015)

Perubahan warna pada zona reaksi biosensor diidentifikasi dengan cara membandingkan nilai *mean* sebelum dan sesudah ditetaskan sampel. Nilai *mean* merupakan nilai rerata pixel yang mempresentasikan tingkat intensitas warna pada gambar yang dianalisa. Warna hitam dilambangkan dengan nilai *mean* sebesar 0, sedangkan warna putih dilambangkan nilai *mean* sebesar 256 (Taylor dan Francis, 2007). Nilai *mean* dapat diketahui dengan memasukkan gambar obyek yang ingin dianalisa pada *software* atau aplikasi editor gambar seperti Adobe Photoshop dan Image J.

Pada penelitian ini, dapat dikatakan bahwa biosensor yang memiliki intensitas warna biru yang kuat akan disimbolkan dengan nilai *mean* yang rendah. Sedangkan biosensor yang menganalisa residu pestisida akan mengalami perubahan intensitas warna biru menjadi lebih pudar pada zona reaksi sehingga nilai *mean* yang ditunjukkan akan semakin tinggi atau mendekati angka 256.

## 4.8 Uji Kualitas Biosensor







### 4.8.1 *Limit of Detection*

*Limit of Detection* atau batas deteksi merupakan parameter yang digunakan untuk mengetahui batas minimal analit yang dapat dideteksi oleh biosensor. Pada penelitian ini *limit of detection* dilakukan dengan cara menambahkan residu pestisida golongan organofosfat jenis profenofos setelah proses fabrikasi biosensor dengan cara sebagai berikut. Pada biosensor yang telah difabrikasi, diberikan pestisida sebanyak 15 µl yang diberikan sebanyak 4 kali dengan rentang waktu 5 menit. Konsentrasi yang digunakan yaitu 0 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 25 ppm dan 200 ppm. Kemudian, dan diamati perubahan warna pada biosensor tersebut setelah waktu inkubasi selama 20 menit dan dilakukan dokumentasi dengan menggunakan *scanner* EPSON TX121. Setelah itu, hasil dokumentasi dikuantitatifkan dengan

menggunakan *software* Adobe Photoshop CS 5 untuk mendapatkan intensitas warna biru melalui rerata nilai piksel atau “*Mean*”. Berikut merupakan hasil analisa visualisasi kolorimetri limit deteksi dengan menggunakan biosensor.

Pada **Tabel 4.7** dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi pestisida maka terjadi perubahan warna biru pada biosensor. Hal ini dikarenakan adanya inhibisi atau penghambatan kerja enzim asetilkolinesterase oleh pestisida profenofos. Pestisida tersebut menonaktifkan asetilkolinesterase dengan cara fosforilasi kelompok hidroksil serin yang berada pada sisi aktif asetilkolinesterase yang akan membentuk senyawa kolinesterase terfosforilasi. Enzim kolinesterase tidak dapat berfungsi lagi yang mengakibatkan kadar aktif dari enzim tersebut berkurang (Wiener, 2004 *dalam* Fiananda, 2014). Berkurangnya aktivitas enzim asetilkolinesterase mengakibatkan menurunnya kemampuan menghidrolisis substrat *indoxyl acetate* menjadi indigo atau produk berwarna biru. Hal inilah yang menyebabkan semakin tinggi konsentrasi pestisida yang digunakan maka warna biru pada pestisida akan semakin pudar.

**Tabel 4.7** Hasil pengujian *Limit of Detection* (residu pestisida profenofos)

Konsentrasi Pestisida	Hasil Visualisasi Kolorimetri	Rerata Nilai <i>Mean</i> (a.u)
0 ppm		189,30 ± 0,67
1 ppm		201,33 ± 1,02
5 ppm		207,87 ± 1,03
10 ppm		235,46 ± 0,79
25 ppm		241,94 ± 1,15
200 ppm		246,56 ± 0,82

Keterangan: a.u (*Arbitrary Unit*),

Setiap data yang tercantum merupakan rerata dari dua kali ulangan

Berdasarkan **Tabel 4.7** didapatkan hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi pestisida maka nilai “*mean*” juga semakin tinggi. Nilai “*mean*” ini sendiri merupakan nilai rerata piksel yang berkorelasi dengan intensitas warna biru

yang tampak pada biosensor. Semakin tinggi nilai "*mean*" berarti bahwa semakin sedikit daerah yang berwarna biru pada zona reaksi.

Pada **Tabel 4.7** dapat diketahui bahwa terjadi kenaikan nilai "*mean*" dari konsentrasi 0 ppm ke konsentrasi 1 ppm. Sehingga dapat dikatakan limit deteksi dari biosensor penelitian ini adalah 1 ppm untuk pestisida profenofos. Apabila dibandingkan dengan penelitian Badawy *et al.* (2014), limit deteksi dari biosensor tersebut untuk pestisida jenis profenofos sebesar  $2,67 \times 10^{-6}$  mM atau  $9,97 \times 10^{-4}$  ppm. Perbedaan ini terjadi dikarenakan adanya perbedaan konsentrasi dan jumlah enzim serta substrat yang digunakan. Pada Badawy *et al.* (2014), menggunakan konsentrasi enzim sebesar 1000 unit/ml dengan volume enzim yang digunakan untuk biosensor yaitu 1000  $\mu$ l. Sedangkan pada penelitian digunakan konsentrasi enzim sebesar 26 unit/ml dengan volume enzim yang digunakan untuk biosensor sebesar 5  $\mu$ l. Karena konsentrasi dan volume enzim yang digunakan pada penelitian ini lebih sedikit maka nilai limit deteksi pada pestisida profenofos lebih besar dibandingkan dengan limit deteksi literatur.

Limit deteksi yang dihasilkan dari biosensor ini adalah 1 ppm sedangkan menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) batas maksimum residu pestisida adalah 5 mg/kg atau 5 ppm. Sehingga dapat dikatakan biosensor dapat digunakan untuk mengetahui residu pestisida dengan konsentrasi di bawah 5 ppm.

#### **4.8.2 Waktu Respon**

Uji waktu respon merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan oleh enzim asetilkolinesterase untuk menghidrolisis substrat *indoxyl acetate*. Selain itu waktu respon juga dilakukan untuk mengetahui seberapa cepat biosensor untuk mendeteksi suatu target, di mana dalam penelitian ini target yang dideteksi adalah pestisida organofosfat jenis profenofos.

#### **1. Waktu respon Terhadap Substrat**







Uji ini dilakukan dengan cara sebagai berikut enzim asetilkolinesterase 26 Unit/ml diambil sebanyak 5  $\mu$ l kemudian ditambah sol-gel dengan volume 5  $\mu$ l. Enzim dan sol-gel tersebut dilakukan *pipetting* agar keduanya tercampur secara homogen. Lalu ditetaskan enzim dan sol-gel yang telah tercampur pada kertas Whatman No. 1. Selanjutnya, ditambahkan substrat *indoxyl*

*acetate* 5 mg/ml sebanyak 5  $\mu$ l. Dilakukan pengamatan perubahan warna selama 10 menit. dan dilakukan dokumentasi dengan menggunakan *scanner* EPSON TX121. Setelah itu, hasil dokumentasi dikuantitatifkan dengan menggunakan *software* Adobe Photoshop CS 5 untuk mendapatkan intensitas warna biru melalui rerata nilai piksel atau "*Mean*". Berikut merupakan hasil analisa visualisasi kolorimetri limit deteksi dengan menggunakan biosensor.

Berdasarkan hasil **Tabel 4.8** didapatkan hasil bahwa semakin lama waktu inkubasi, zona reaksi pada biosensor akan berubah warna dari putih menjadi biru secara bertahap. Perubahan intensitas warna ini berkorelasi dengan rerata nilai *mean*, dimana semakin pekat intensitas warna biru maka nilai *mean*-nya semakin rendah. Pada menit ke-4 warna biru mulai terbentuk pada bagian pinggir zona reaksi kemudian menyebar merata pada seluruh zona reaksi pada menit ke-8 dan warna biru tersebut makin pekat pada menit ke-10. Dengan demikian, biosensor pada penelitian ini memiliki waktu respon minimal selama 4 menit. Akan tetapi, warna tersebut terlihat lebih jelas pada menit ke-8. Hal tersebut menunjukkan bahwa enzim asetilkolinesterase 26 unit/ml ini dapat menghidrolisis *indoxyl acetate* setidaknya dalam waktu 4 menit.

Apabila dibandingkan dengan biosensor yang diteliti oleh Sakti (2017), dengan menggunakan enzim asetilkolinesterase konsentrasi yang sama, waktu respon yang dihasilkan oleh biosensor tersebut adalah 3 menit. Perbedaan ini terjadi dikarenakan perbedaan substrat yang digunakan yaitu asetilkolin iodida dan jenis imobilisasi enzim. Pada penelitian Sakti (2017), imobilisasi yang dilakukan yaitu teknik adsorpsi di mana enzim teradsorpsi pada *platform* kertas Whatman No. 1. Sedangkan pada penelitian ini, dilakukan imobilisasi teknik *entrapment* sol-gel. Menurut Vamavakiki *et al.* (2005), sol-gel dapat membatasi pergerakan enzim oleh matriks-matriks silika yang terbentuk. Sehingga dapat dikatakan reaksi antara enzim dengan substrat menjadi sedikit terhambat akibat terperangkap dalam matriks sol-gel, hal ini lah yang menyebabkan waktu respon menjadi lebih lama.

**Tabel 4.8** Hasil pengujian waktu respon biosensor terhadap *indoxyl acetate*

Menit ke-	Hasil Visualisasi Kolorimetri	Rerata Nilai <i>Mean</i> (a.u)
0		254,68 ± 0,84
2		253,46 ± 0,67
4		251,25 ± 1,09
6		250,52 ± 1,11
8		244,81 ± 1,20
10		231,22 ± 0,93

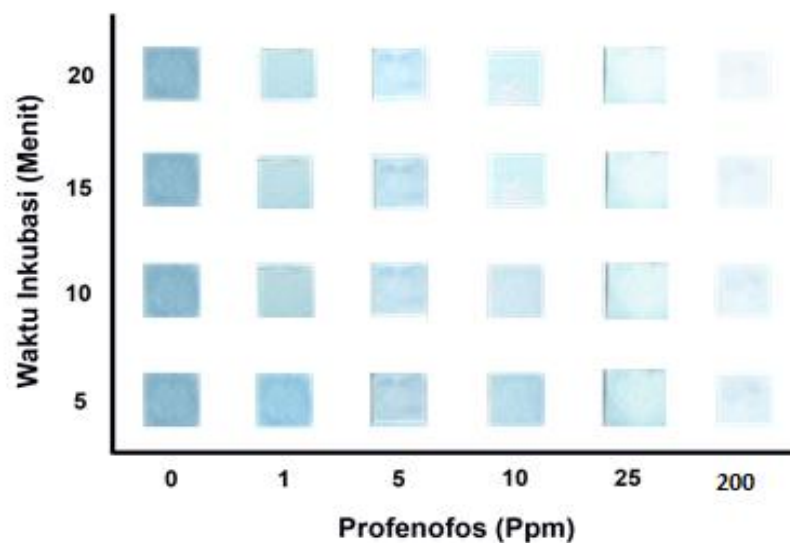
Keterangan: a.u (*Arbitrary Unit*)

Setiap data yang tercantum merupakan rerata dari dua kali ulangan

## 2. Waktu Respon Terhadap Pestisida Profenofos

Profenofos merupakan salah satu pestisida dari golongan organofosfat. Profenofos ini memiliki spektrum yang luas untuk berbagai jenis hama seperti ulat grayak (*Spodoptera litura*) yang menyerang sayuran seperti cabai, kubis, kangkung, selada, bayam dan tanaman lain (Rukmana, 2003). Seperti pestisida jenis organofosfat lainnya, profenofos memiliki mekanisme sebagai inhibitor enzim asetilkolinesterase pada hama sehingga menyebabkan terganggunya sintesis asetilkolin pada sistem saraf pusat yang dapat mengakibatkan kematian hama tersebut (Gotoh *et al.*, 2001). Apabila dikaitkan dengan toksisitasnya, profenofos digolongkan menjadi pestisida dengan toksisitas sedang atau *moderately severe toxicity*. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Eddleston *et al.* (2009), selama 5 tahun terakhir terdapat 95 kasus keracunan profenofos di Sri Lanka dengan 11 orang diantaranya meninggal dunia akibat keracunan tersebut. Keracunan profenofos tersebut akan menyebabkan terhambatnya kerja enzim asetilkolinesterase yang diikuti dengan menurunnya tingkat Hemoglobin (Hb) yang membuat jumlah oksigen dalam darah turun. Hal tersebut dapat mengakibatkan gagal pernafasan dan apabila tidak diberikan penanganan lebih lanjut akan menyebabkan kematian.

Uji waktu respon terhadap profenofos ini dilakukan dengan cara sebagai yang sama seperti uji waktu respon terhadap substrat. Akan tetapi, setelah dilakukan penambahan *indoxyl acetate* dan dilakukan inkubasi selama 20 menit .Selanjutnya, diteteskan pestisida sebanyak 15  $\mu$ l yang diberikan sebanyak 4 kali dengan rentang waktu 5 menit. Konsentrasi yang digunakan yaitu 0 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 25 ppm dan 200 ppm. Kemudian, dan diamati perubahan warna pada biosensor tersebut setelah waktu inkubasi selama 20 menit dan dilakukan dokumentasi dengan menggunakan *scanner* EPSON TX121.



**Gambar 4.12** Hasil Visualisasi Waktu Respon Biosensor Terhadap Pestisida

Berdasarkan **Gambar 4.12** diketahui bahwa waktu respon biosensor terhadap pestisida tergantung pada konsentrasi pestisida yang digunakan. Pada uji tersebut, pestisida profenofos dengan konsentrasi 1 dan 5 ppm terjadi perubahan intensitas warna pada menit ke-15. Sedangkan pada konsentrasi 10 ppm terjadi perubahan warna pada menit ke-10. Konsentrasi profenofos 25 dan 200 ppm dapat merubah intensitas warna biru pada menit ke-5. Hal tersebut dikarenakan semakin tinggi pestisida maka semakin banyak enzim yang terhambat aktivitasnya. Profenofos menonaktifkan asetilkolinesterase dengan cara fosforilasi kelompok hidroksil serin yang berada pada sisi aktif asetilkolinesterase yang akan membentuk senyawa kolinesterase terfosforilasi. Enzim kolinesterase tidak dapat berfungsi lagi yang mengakibatkan kadar aktif dari enzim tersebut berkurang (Wiener, 2004 dalam Fiananda, 2014). Berkurangnya enzim kolinesterase mengakibatkan

menurunnya kemampuan menghidrolisis substrat *indoxyl acetate* sehingga intensitas warna biru pada biosensor menjadi berkurang.

#### 4.8.3 Stabilitas Biosensor Terhadap Suhu

Stabilitas biosensor terhadap suhu merupakan salah satu parameter kualitas biosensor (Lee, 2005). Pengujian stabilitas suhu terhadap biosensor ini bertujuan untuk mengetahui suhu penyimpanan biosensor, dimana biosensor masih dapat bekerja dengan baik. Suhu yang digunakan dalam uji ini adalah

-4<sup>0</sup>C (suhu refrigerator), 25<sup>0</sup>C (ruang terbuka laboratorium), dan 40<sup>0</sup>C (inkubator) selama 24 jam. Perlakuan kontrol pada uji ini adalah imobilisasi enzim dengan teknik adsorpsi pada kertas Whatman No. 1, tujuan adanya perlakuan kontrol adalah untuk membandingkan teknik imobilisasi yang paling baik untuk enzim asetilkolinesterase. Berikut merupakan hasil stabilitas biosensor terhadap suhu.

**Tabel 4.9** Hasil Stabilitas Biosensor Terhadap Suhu

Imobilisasi Teknik <i>Entrapment</i> dengan Sol-gel			Imobilisasi Teknik Adsorpsi dengan Kertas Whatman No.1		
Suhu (°C)	Jumlah Enzim Terimobilisasi (%)	Aktivitas Enzim Terimobilisasi (%)	Suhu	Jumlah Enzim Terimobilisasi (%)	Aktivitas Enzim Terimobilisasi (%)
-4	81,82 ± 2,45	72,72 ± 2,41	-4	63,64 ± 3,21	59,09 ± 2,11
25	77,27 ± 2,76	68,18 ± 0,00	25	59,09 ± 2,11	50,00 ± 3,21
40	63,64 ± 3,21	52,91 ± 3,01	40	50,00 ± 2,91	37,91 ± 0,00

Keterangan: Setiap data yang tercantum merupakan rerata dari dua kali ulangan

Berdasarkan **Tabel 4.9** didapatkan hasil bahwa baik nilai jumlah enzim terimobilisasi dan aktivitas enzim terimobilisasi yang diimobilisasi dengan menggunakan teknik *entrapment* lebih tinggi dibandingkan dengan teknik adsorpsi di suhu -4, 25, dan 40 °C. Untuk mengetahui perbedaan hasil baik jumlah enzim terimobilisasi dengan teknik *entrapment* dan adsorpsi maka dilakukan t-Test menggunakan *software Microsoft Excel* dengan tingkat kepercayaan sebesar 95%. Hasil analisa tersebut ditunjukkan pada **Tabel 4.10**.

**Tabel 4.10** Hasil Analisa t-Test Stabilitas Jumlah Enzim Terimobilisasi Terhadap Suhu Penyimpanan

	Teknik <i>Entrapment</i>	Teknik Adsorpsi
Mean	74,24333333	57,57666667
Variance	89,49863333	48,23003333
Observations	3	3
Pooled Variance	68,86433333	
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	4	
t Stat	2,45978532	
P(T<=t) one-tail	0,034853761	
t Critical one-tail	2,131846786	

Berdasarkan hasil **Tabel 4.10** didapatkan data bahwa nilai *t Stat* atau *t* hitung sebesar 2,459 yang lebih besar dari *t critical one-tail* atau *t*-tabel yaitu 2,131. Nilai *p-value* pada uji tersebut adalah 0,0348 yang nilainya kurang dari *p-alpha* yaitu 0,05 Hal ini menunjukkan bahwa imobilisasi enzim asetilkolinesterase dengan teknik *entrapment* secara signifikan memiliki jumlah enzim terimobilisasi lebih banyak daripada teknik adsorpsi pada berbagai suhu penyimpanan yaitu -4, 25, dan 40°C.

Selanjutnya dilakukan uji t-Test untuk mengetahui perbedaan aktivitas enzim terimobilisasi dengan menggunakan teknik *entrapment* dan adsorpsi. Analisa statistik tersebut dilakukan t-Test dengan tingkat kepercayaan sebesar 95%.

Berdasarkan hasil **Tabel 4.11** didapatkan data bahwa nilai *t Stat* atau *t* hitung sebesar 2,394 yang lebih besar dari *t critical one-tail* atau *t*-tabel yaitu 2,131. Nilai *p-value* pada uji tersebut adalah 0,0373 yang nilainya kurang dari *p-alpha* yaitu 0,05 Hal ini menunjukkan bahwa imobilisasi enzim asetilkolinesterase dengan teknik *entrapment* secara signifikan memiliki aktivitas enzim terimobilisasi lebih banyak daripada teknik adsorpsi pada berbagai suhu penyimpanan yaitu -4, 25, dan 40°C.



**Tabel 4.11** Hasil Analisa t-Test Stabilitas Aktivitas Enzim Terimobilisasi Terhadap Suhu Penyimpanan

	Teknik <i>Entrapment</i>	Teknik Adsorpsi
Mean	59,09333333	45,97
Variance	20,65703333	69,4252
Observations	3	3
Pooled Variance	45,04111667	
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	4	
t Stat	2,39488804	
P(T<=t) one-tail	0,037384944	
t Critical one-tail	2,131846786	

Pada teknik *entrapment* secara signifikan memiliki jumlah dan aktivitas enzim yang lebih baik daripada teknik adsorpsi terhadap berbagai suhu penyimpanan yaitu -4, 25, dan 40°C. Hal ini dikarenakan enzim terperangkap dalam matriks sol-gel yang dapat melindungi enzim dari lingkungan sekitar termasuk suhu penyimpanan (Malhotra, 2003). Hal ini sesuai dengan penelitian Sahin *et al.* (2005), aktivitas enzim terbaik pada perlakuan enzim diimobilisasi dengan menggunakan media karagenan suhu -4°C dengan aktivitas 82% dan pada suhu 40°C mengalami penurunan aktivitas enzim menjadi 55%. Penurunan aktivitas enzim ini dikarenakan adanya denaturasi enzim yang terimobilisasi pada struktur tersier dari rantai peptida enzim asetilkolinesterase.

#### 4.8.4 Stabilitas Biosensor Terhadap Waktu

Uji stabilitas biosensor terhadap waktu dilakukan untuk mengetahui efektifitas sol-gel sebagai media imobilisasi enzim untuk mempertahankan aktivitas katalitik enzim asetilkolinesterase. Uji stabilitas biosensor ini dilakukan selama 5 hari dan dilakukan analisa jumlah dan aktivitas enzim terimobilisasi. Perlakuan kontrol pada uji ini adalah imobilisasi enzim dengan teknik adsorpsi pada kertas Whatman No. 1, tujuan adanya perlakuan kontrol adalah untuk membandingkan teknik imobilisasi yang paling baik untuk enzim asetilkolinesterase yang disimpan selama 5 hari pada suhu 4°C. Berikut merupakan hasil stabilitas biosensor terhadap waktu.

**Tabel 4.12** Hasil Stabilitas Biosensor Terhadap Waktu

Imobilisasi Teknik <i>Entrapment</i> dengan Sol-gel			Imobilisasi Teknik Adsorpsi dengan Kertas Whatman No.1		
Hari ke-	Jumlah Enzim Terimobilisasi (%)	Aktivitas Enzim Terimobilisasi (%)	Hari ke-	Jumlah Enzim Terimobilisasi (%)	Aktivitas Enzim Terimobilisasi (%)
0	81,82 ± 2,45	72,72 ± 2,41	0	63,64 ± 3,21	59,09 ± 2,11
1	81,49 ± 2,76	72,01 ± 2,11	1	62,79 ± 1,91	58,30 ± 3,91
2	81,28 ± 1,98	71,87 ± 1,97	2	62,05 ± 2,88	58,21 ± 2,40
3	80,64 ± 2,21	71,32 ± 1,76	3	61,78 ± 3,10	57,50 ± 2,77
4	80,23 ± 1,78	71,06 ± 2,43	4	61,34 ± 2,81	56,78 ± 2,31
5	80,17 ± 2,31	70,98 ± 2,02	5	60,33 ± 1,56	56,21 ± 1,77

Keterangan: Setiap data yang tercantum merupakan rerata dari dua kali ulangan

Berdasarkan **Tabel 4.12** didapatkan data bahwa jumlah enzim dan aktivitas enzim yang diimobilisasi dengan menggunakan teknik *entrapment* media sol-gel lebih tinggi daripada enzim yang diimobilisasi dengan teknik adsorpsi pada hari ke-0 sampai ke-5. Pada jumlah enzim yang diimobilisasi teknik *entrapment* mengalami penurunan jumlah enzim sebanyak 97,98% sedangkan pada enzim dengan imobilisasi adsorpsi terjadi penurunan jumlah enzim sebanyak 95,28%. Pada aktivitas enzim asetilkolinesterase yang diimobilisasi teknik *entrapment* mengalami penurunan jumlah enzim sebanyak 97,60% sedangkan pada enzim dengan imobilisasi adsorpsi terjadi penurunan jumlah enzim sebanyak 95,12%. Berdasarkan data tersebut didapatkan hasil bahwa enzim asetilkolinesterase yang diimobilisasi dengan teknik *entrapment* lebih baik daripada imobilisasi teknik adsorpsi. Untuk mengetahui perbedaan hasil baik jumlah enzim terimobilisasi dengan teknik *entrapment* dan adsorpsi maka dilakukan t-Test menggunakan *software Microsoft Excel* dengan tingkat kepercayaan sebesar 95%. Hasil analisa tersebut ditunjukkan pada **Tabel 4.13**.

**Tabel 4.13** Hasil Analisa t-Test Stabilitas Jumlah Enzim Terimobilisasi Terhadap Waktu Penyimpanan

	Teknik <i>Entrapment</i>	Teknik Adsorpsi
Mean	80,93833	61,98833
Variance	0,475897	1,317657
Observations	6	6
Pooled Variance	0,896777	
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	10	
t Stat	34,65993	
P(T<=t) one-tail	4,73 x 10 <sup>-12</sup>	
t Critical one-tail	1,812461	

Berdasarkan hasil **Tabel 4.13** didapatkan data bahwa nilai *t Stat* atau *t* hitung sebesar 34,65 yang lebih besar dari *t critical one-tail* atau *t-tabel* yaitu 1,51. Nilai *p-value* pada uji tersebut adalah  $4,73 \times 10^{-12}$  yang nilainya kurang dari *p-alpha* yaitu 0,05 Hal ini menunjukkan bahwa imobilisasi enzim asetilkolinesterase dengan teknik *entrapment* secara signifikan memiliki jumlah enzim terimobilisasi lebih banyak daripada teknik adsorpsi pada waktu penyimpanan 5 hari dengan suhu  $-4^{\circ}\text{C}$ .

Selanjutnya dilakukan uji t-Test untuk mengetahui perbedaan aktivitas enzim terimobilisasi dengan menggunakan teknik *entrapment* dan adsorpsi. Analisa statistik tersebut dilakukan t-Test dengan tingkat kepercayaan sebesar 95%.

**Tabel 4.14** Hasil Analisa t-Test Stabilitas Aktivitas Enzim Terimobilisasi Terhadap Waktu Penyimpanan

	Teknik <i>Entrapment</i>	Teknik Adsorpsi
Mean	71,66	57,68167
Variance	0,44564	1,131337
Observations	6	6
Pooled Variance	0,788488	
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	10	
t Stat	27,26581	
P(T<=t) one-tail	$5,1 \times 10^{-11}$	
t Critical one-tail	1,812461	

Berdasarkan hasil **Tabel 4.14** didapatkan data bahwa nilai *t Stat* atau *t* hitung sebesar 27,26 yang lebih besar dari *t critical one-tail* atau *t-tabel* yaitu 1,812. Nilai *p-value* pada uji tersebut adalah  $5,1 \times 10^{-11}$  yang nilainya kurang dari *p-alpha* yaitu 0,05 Hal ini menunjukkan bahwa imobilisasi enzim asetilkolinesterase dengan teknik *entrapment* secara signifikan memiliki aktivitas enzim terimobilisasi lebih banyak daripada teknik adsorpsi setelah disimpan selama 5 hari pada suhu  $-4^{\circ}\text{C}$ .

Hal ini berkaitan dengan sol-gel yang dapat melindungi enzim selama penyimpanan karena sisa air dari proses pembentukan matriks silika dapat digunakan enzim untuk mempertahankan aktivitasnya. Enzim membutuhkan air dalam kadar tertentu untuk menjaga konformasi strukturnya sehingga aktivitasnya dapat dipertahankan. Selain itu, matriks silika pada sol-gel dapat

meningkatkan stabilitas enzim terhadap suhu sehingga aktivitas enzim dapat dipertahankan (Bhatia dan Brinker, 2000).

#### 4.8.5 Hasil Uji Akurasi Biosensor







Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya yang dinyatakan dalam persen (Riyanto, 2014). Secara garis besar, prosedur pengujian akurasi ini dilakukan dengan membandingkan nilai *mean* konsentrasi pestisida ditambahkan atau diuji tingkat akurasinya ( $X_0$ ) dengan nilai *mean* konsentrasi pestisida dari persamaan regresi linear ( $X_1$ ). Nilai *mean* tersebut berkorelasi dengan intensitas warna biru yang dihasilkan oleh biosensor setelah diteteskan pestisida.

Untuk membuat regresi linear didapatkan ketika biosensor diteteskan pestisida profenofos dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm setelah inkubasi selama 20 menit. Kemudian, hasil perubahan warna yang terbentuk didokumentasikan dengan menggunakan *Scanner* EPSON TX121. Hasil tersebut selanjutnya dikuantifikasikan menjadi *mean* yang berkorelasi dengan intensitas warna biru yang terbentuk pada biosensor. Setelah itu, nilai *mean* untuk masing-masing konsentrasi dibuat regresi linear untuk mendapatkan persamaan regresi linear.

Pada uji ini, profenofos yang diberikan yaitu dalam rentang konsentrasi 0-5 ppm. Konsentrasi 0 ppm dipilih sebagai kontrol yaitu biosensor tanpa residu pestisida sedangkan konsentrasi 5 ppm dipilih sebagai batas atas dikarenakan nilai Batas Maksimum Residu (BMR) profenofos di Indonesia adalah 5 ppm. Dimana pada konsentrasi tersebut merupakan batas maksimal residu yang diperbolehkan pada sayuran yang bertujuan untuk mencegah kemungkinan terjadinya bahaya profenofos untuk konsumen. Konsentrasi uji akurasi ini dimulai dari konsentrasi pestisida 3 ppm dikarenakan pada konsentrasi 1 dan 2 ppm intensitas warna secara kasat mata tidak jauh beda dari kontrol atau biosensor tanpa residu pestisida. Sehingga untuk konsentrasi 1 dan 2 ppm akan dijadikan sebagai konsentrasi pestisida yang diuji tingkat akurasinya ( $X_0$ ) pada regresi linear ( $X_1$ ).

Berikut merupakan hasil visualisasi dan rerata nilai “*mean*” untuk uji akurasi biosensor.

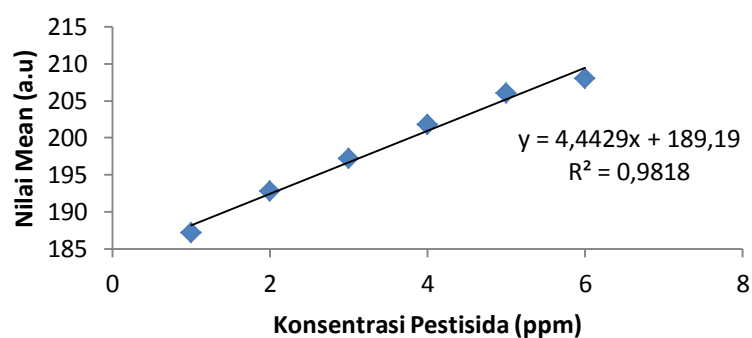
**Tabel 4.15** Hasil Visualisasi dan Rerata Nilai “Mean” untuk Uji Akurasi

Konsentrasi Pestisida	Hasil Visualisasi Kolorimetri	Nilai <i>Mean</i> (a.u)
0 ppm		187,21 ± 1,68
1 ppm		192,76 ± 1,32
2 ppm		197,22± 1,78
3 ppm		201,78± 1,01
4 ppm		206,20± 2,22
5 ppm		208,01± 1,65

Keterangan: a.u (*Arbitrary Unit*)

Setiap data yang tercantum merupakan rerata dari dua kali ulangan



Pada tabel tersebut merupakan nilai rerata *mean* pengujian pestisida profenofos dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm. Dari rerata nilai *mean* tersebut selanjutnya dijadikan regresi linear atau  $X_1$ . Regresi liner dari rerata nilai *mean* tersaji pada **Gambar 4.13**.



**Gambar 4.13** Regresi Linear Rerata Nilai *Mean* dengan Konsentrasi Pestisida 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm

Langkah selanjutnya yaitu membuat pestisida dengan konsentrasi 1 dan 2 ppm (sebagai  $X_0$ ) yang akan diuji akurasinya. Profenofos dengan konsentrasi 1 dan 2 ppm ditetaskan ke biosensor yang telah dilakukan fabrikasi. Kemudian diamati perubahan warna setelah 20 menit dan dilakukan dokumentasi dengan menggunakan *scanner* EPSON TX121. Setelah itu, hasil *scanner* tersebut kemudian dikuantitatifkan menggunakan *software image editor* Adobe Photoshop® CS 3 untuk mendapatkan rerata nilai piksel yang berkorelasi dengan persebaran dan intensitas warna biru. Rerata nilai piksel ditunjukkan dengan tanda “*Mean*” yang muncul pada dialog histogram (Martinez *et. al.*, 2008). Adapun dokumentasi biosensor yang diintroduksi pestisida dengan konsentrasi 1 dan 2 ppm dapat dilihat pada **Tabel 4.16**.

**Tabel 4. 16** Rerata Nilai *Mean* dan Visualisasi Biosensor ditambah 1 dan 2 ppm Pestisida Profenofos

Konsentrasi Pestisida (ppm)	Hasil	Nilai <i>Mean</i> (a.u)	Konsentrasi Pestisida (ppm) berdasarkan Regresi Linear	Akurasi (%)
1		192,76 ±0,57	0,803	80,30
2		197,22 ±0,95	1,807	90,35
Rata-rata nilai akurasi (%)				85,325%

Keterangan: a.u (*Arbitrary Unit*)

Setiap data yang tercantum merupakan rerata dari dua kali ulangan

Pada **Tabel 4.16** dapat dilihat bagaimana respon intensitas warna biru apabila diberikan pestisida dengan konsentrasi 1 dan 2 ppm. Pada konsentrasi 1 ppm nilai *mean*-nya sebesar 199,53 kemudian pada konsentrasi 2 ppm nilai *mean*-nya sebesar 201,48. Nilai mean yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam persamaan yang ada pada regresi linear, yaitu  $y = 4,4429x + 189,19$ . Sumbu y adalah nilai *mean*, dan sumbu x adalah nilai konsentrasi pestisida ( $X_1$ ). Melalui persamaan tersebut dapat diketahui bahwa akurasi pada konsentrasi pestisida 1 ppm adalah 75,10%, dan akurasi pada pestisida 2 ppm sebesar 90,35%. Dengan demikian dapat dihitung rerata prosentase akurasi alat ini dan diperoleh hasil bahwa nilai akurasi dalam mendeteksi keberadaan residu pestisida yakni sebesar 85,325%. Apabila dibandingkan dengan literatur Sakti (2017), dengan penelitian biosensor RAPDE sebagai pendeteksi pestisida golongan karbamat nilai akurasi

biosensor tersebut adalah 91,91%. Perbedaan ini mungkin dikarenakan perbedaan substrat yang digunakan serta teknik imobilisasi enzim asetilkolinesterase. Pada literatur tersebut enzim diimobilisasikan dengan teknik adsorpsi dimana enzim hanya terikat pada *platform* yang digunakan yaitu kertas Whatman No. 1. Kelebihan teknik adsorpsi tersebut adalah difusi serta kontak antara enzim dan substrat lebih cepat. Sedangkan pada penelitian ini, enzim diimobilisasikan dengan teknik *entrapment*. Salah satu kelemahan dari metode imobilisasi *entrapment* adalah difusi enzim menjadi terbatas karena enzim terperangkap dalam matriks silika sehingga kontak antara enzim dan substrat menjadi berkurang (Vamavakiki *et al.*, 2005).

#### **4.8.6 Uji Residu Pestisida Pada Sayuran**

Uji ini dilakukan untuk mengetahui aplikasi biosensor dalam mendeteksi residu pestisida pada sayuran selada. Sayur selada dipilih karena menurut Gonzalez *et al.* (2007), tanaman selada memiliki budidaya tanam yang relatif pendek yaitu 4-5 minggu. Selain itu, selada sangat rentan atau mudah rusak akibat serangan hama. Sehingga, para petani cenderung memberikan pestisida dengan jumlah yang lebih banyak pada selada dibandingkan dengan sayuran lain. Di lain pihak, konsumsi selada biasanya dalam bentuk segar yaitu sebagai salad atau gado-gado sehingga meningkatkan resiko keracunan apabila pada selada tersebut ditemukan residu pestisida dalam jumlah yang besar.




Uji ini dilakukan dengan dua macam yaitu uji pada sayur selada organik dan selada yang diambil secara acak di Pasar Dinoyo. Pada uji selada organik dilakukan untuk mengetahui tingkat akurasi biosensor dalam mendeteksi residu pestisida pada sayur selada. Sedangkan uji pada selada yang diambil dari pasar dilakukan untuk mengetahui paparan residu pestisida dalam sayur selada yang dijual di Pasar Dinoyo.

#### **1. Uji Residu Pestisida Profenofos pada Selada Organik**

Tahapan yang dilakukan pada uji ini yaitu dilakukan dengan cara sayuran selada organik merek Kaliandra ditimbang sebanyak 5 gram dan disemprot dengan 5 ml pestisida merek Callicron (bahan aktif profenofos) dengan konsentrasi 0, 1, 5, 10, dan 25 ppm. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam di suhu ruang agar pestisida terserap pada sayuran. Kemudian selada dilakukan pencacahan dan direndam pada buffer Tris-Cl 20 mM pH 7,5 dengan volume 5 ml selama 15 menit. Tujuannya yaitu untuk melarutkan

residu pestisida pada selada. Selanjutnya rendaman buffer tersebut diambil sebanyak 15 µl yang diberikan sebanyak 4 kali dengan rentang waktu 5 menit. Kemudian, diamati perubahan warna pada biosensor selama 20 menit dan dilakukan dokumentasi dengan menggunakan *scanner* EPSON TX121.

**Tabel 4. 17** Rerata Nilai *Mean* dan Visualisasi Biosensor Pada Aplikasi Selada Organik

Konsentrasi Pestisida (ppm)	Hasil Visualisasi Kolorimetri	Nilai <i>Mean</i> (a.u)	Konsentrasi Pestisida Berdasarkan Regresi Linear	Akurasi (%)
1 ppm		191,98 ± 0,96	0,628 ppm	62,79
5 ppm		206,48 ± 1,07	3,892 ppm	77,83
10 ppm		224,71 ± 1,12	7,994 ppm	79,94
Rata-rata nilai akurasi (%)				73,52

Keterangan: a.u (*Arbitrary Unit*)

Setiap data yang tercantum merupakan rerata dari dua kali ulangan

Pada **Tabel 4.17** didapatkan hasil bahwa biosensor dapat mendeteksi pestisida pada selada organik pada tingkat rata-rata nilai akurasi sebesar 73,52%. Apabila dibandingkan dengan nilai akurasi biosensor yang ditetaskan pestisida secara langsung yaitu 85,325% maka nilai akurasi biosensor yang diaplikasikan di sayur selada organik lebih rendah. Hal ini mungkin dikarenakan adanya degradasi pestisida selama penyimpanan di suhu ruang selama 24 jam. Degradasi tersebut dipengaruhi oleh volatilitas dari profenofos selama penyimpanan sayur (Miskiyah dan Munarso, 2009).







Sedangkan residu pestisida yang ditemukan di selada dan sayuran lain biasanya terdapat pada bagian lapisan lilin pada daun sayuran. Setelah aplikasi penyemprotan pestisida pada sayuran, pestisida tersebut akan teradsorpsi pada lapisan atas sayuran, kemudian berdifusi menuju lapisan lilin dari kutikula dan terserap pada sel-sel yang ada pada sayuran tersebut. Hal tersebut menyebabkan adanya residu pestisida di dalam sayuran (Gonzales *et al.*, 2007).



## 2. Aplikasi Deteksi Pestisida pada Sayuran di Pasar Dinoyo

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan biosensor untuk melakukan deteksi residu pestisida pada sayuran selada yang dijual di pasaran. Sampel sayur selada diambil dari 5 pedagang sayur yang ada di Pasar Dinoyo. Berikut merupakan hasil aplikasi deteksi pestisida pada sayuran yang dijual di pasar.

**Tabel 4.17** Hasil Aplikasi Biosensor untuk Deteksi Pestisida pada Selada di Pasar Dinoyo

Sampel	Hasil Visualisasi Kolorimetri	Rerata Nilai <i>Mean</i> (a.u)	Konsentrasi Pestisida Berdasarkan Regresi Linear
Kontrol (Selada Tanpa Residu Pestisida)		187,92 ± 1,06	0 ppm
Selada 1		193,46 ± 1,07	0,961 ppm
Selada 2		188,31 ± 0,97	0 ppm
Selada 3		206,52 ± 1,61	3,900 ppm
Selada 4		201,81 ± 0,92	2,840 ppm
Selada 5		188,87 ± 1,30	0 ppm

Keterangan: a.u (*Arbitrary Unit*)

Setiap data yang tercantum merupakan rerata dari dua kali ulangan

Berdasarkan **Tabel 4.11** dapat diketahui bahwa sampel selada yang dijual di pasar Dinoyo yang diambil secara acak, 3 diantara 5 sampel selada terdapat residu pestisida yaitu pada sampel yang dijual pedagang 1, 3 dan 4. Hal tersebut dibuktikan dengan semakin pudarnya intensitas warna biru pada zona reaksi setelah ditetaskan buffer hasil rendaman sayur selada. Dari ke- 5 sampel, sampel selada yang dijual oleh pedagang 3 memiliki intensitas warna biru yang paling terang dibandingkan dengan kontrol dan sampel sayur selada lain. Jika dilihat dari nilai “*mean*” dan konsentrasi pestisida berdasarkan

regresi linear, sampel selada 3 juga memiliki nilai residu pestisida paling tinggi yaitu 3,900 ppm. Akan tetapi, konsentrasi residu pestisida tersebut masih dibawah batas residu maksimum (BMR) untuk pestisida profenofos yang ditetapkan oleh SNI yaitu 5 ppm.

Apabila dibandingkan dengan literatur yang dilakukan pengujian residu pestisida pada sayuran selada di daerah Lampung dengan menggunakan GC-MS terdapat beberapa sampel yang mengandung residu pestisida sebanyak 3,02 ppm; 0,79 ppm; 1,67 ppm (Dalimunthe, 2012). Hasil uji residu pestisida pada sampel ini tidak jauh berbeda dengan literatur tersebut sehingga dapat dikatakan bahwa biosensor ini memiliki kemampuan semi-kuantitatif yang cukup baik dalam mendeteksi residu pestisida profenofos pada sayuran selada.

## V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini didapatkan bahwa hasil optimasi sol-gel untuk faktor rasio molar TEOS:H<sub>2</sub>O adalah 1:8,58 sedangkan untuk faktor konsentrasi NaOH adalah 4,09 mM. Dari optimasi sol-gel tersebut didapatkan hasil verifikasi jumlah enzim terimobilisasi sebesar  $84,09 \pm 3,21\%$  sedangkan aktivitas enzim yang didapat yaitu  $70,45 \pm 3,81\%$ . Enzim asetilkolinesterase yang diimobilisasi dengan sol-gel tersebut kemudian diaplikasikan untuk biosensor pendeteksi pestisida dan didapatkan hasil limit deteksi pestisida profenofos sebesar 1 ppm, waktu respon minimal untuk bereaksi dengan substrat yaitu 4 menit. Sedangkan waktu respon untuk pestisida bergantung pada konsentrasi pestisida tersebut. Suhu terbaik untuk penyimpanan biosensor yaitu pada suhu -4°C. Setelah dilakukan penyimpanan selama 5 hari, jumlah dan aktivitas relatif enzim asetilkolinesterase mengalami penurunan masing-masing sebanyak 2,02% dan 2,40%.

### 5.2 Saran

1. Sebaiknya dilakukan pengujian analisa residu pestisida organofosfat selain profonefos pada biosensor.
2. Selain itu, agar dilakukan analisa residu pestisida golongan karbamat. Hal ini dikarenakan karbamat merupakan inhibitor enzim asetilkolinesterase.
3. Untuk mengoptimalkan kinerja biosensor perlu dilakukan optimasi konsentrasi enzim asetilkolinesterase serta substrat *indoxyl acetate*.
4. Perlu dilakukan analisa stabilitas biosensor terhadap waktu yang lebih lama untuk mengetahui *shelf life* biosensor ini.
5. Agar dilakukan analisa residu pestisida yang ada pada komoditas lain seperti buah-buahan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alegantina, S., Raini, M., Lestari, P. 2005. *Penelitian Kandungan Organofosfat dalam Tomat dan Slada yang Beredar di Beberapa Jenis Pasar di DKI Jakarta*. Media Litbang Kesehatan XV Nomer 1 tahun 2005
- Altstein, M., Segev, G., Aziz, O., dan Aharonson, N. 1998. *Sol-gel Entrapped Cholinesterase: A Microtiter Plate Method for Monitoring Anti-cholinesterase Compounds*. J. Agric. Food Chem (46): 3318-3324
- Anitha, K., Moham, S., dan Reddy, S. 2004. *Development of Acetylcholinesterase Silica Sol-gel Immobilized Biosensor- An Application Towards Oxydemeton Methyl Detection*. J.Bios (20):848-856
- Appilux, A., Ayudhya, C., Tantimongcolwat, T., dan Prachayasittikul. 2015. *Paper-Based Acetylcholinesterase Inhibition Assay Combining A Wet System for Organophosphate and Carbamate Pesticides Detection*. EXCLI Journal (14): 307-319
- Badawy, M. dan Aswad, A. 2014. *Bioactive Paper Sensor Based on the Acetylcholinesterase for the Rapid Detection of Organophosphate and Carbamate Pesticides*. Journal of Analytical Methods in Chemistry vol. 2013
- Betha, O. 2009. *Amobilisasi Sel Lactobacillus acidophilus FNCC116 dan Bacillus licheniformis F11.4 untuk Demineralisasi dan Deproteinasi Limbah Kulit Udang dalam Pengolahan Kitin*. Thesis. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia
- Brinker, J. dan Scherer, G. 2013. *Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing*. California: Academic Press, Inc
- Dalimunthe, K. 2012. *Analisa Kuantitatif Residu Insektisida Profenofos pada Cabai Merah Segar dan Cabai Merah Giling di Beberapa Pasar Tradisional Kota Medan Tahun 2012*. Skripsi. Medan: Universitas Sumatra Utara
- Dingsoyr, E. Dan Christy, A. 2000. *Effect of Reaction Variables on the Formulation of Silica Particle by Hydrolysis of Tetraethylorthosilicate Using Sodium Hydroxide*. Colloid Polymer Science (116): 67-73
- Direktorat Jendral Prasarana dan Sarana Direktorat Pupuk dan Pestisida Kementerian Pertanian 2008. *Pedoman Pembinaan Penggunaan Pestisida*
- D'Souza S.F. 2001. *Microbial Biosensors*. Biosens. Bioelectron. 16: 337-353.
- Eddleston, M., Worek, F., Eyer, P., Thiermann, Meyer, L., Jeganathan, M., Sherif, M., Dawson, A. Buckley, A., 2009. *Poisoning with the S-Alkyl Organophosphorus Insecticides Profenofos and Prothiofos*. Inggris: Oxford Journal of Medicine 102(11):785-792

- Fiananda, A. *Hubungan antara Aktivitas Asetilkolinesterase Darah dan Waktu Reaksi Petani Kentang dengan Paparan Kronik Pestisida Organofosfat*. Thesis. Fakultas Kedokteran, Universitas Dlponegoro
- Gaspersz, V., 1992. *Analisis Sistem Terapan : Berdasarkan Pendekatan Teknik Industri*. Bandung: Penerbit Tarsito
- Gotoh, M., Hamada, K., Yamakawa, H, 2001. *Interleukin-1- Induced Subacromial Synovitis and Pain in Rotator Cuff Diseases*. *Rheumatology* (40):995–1001.
- Gonzales, R., Rial, O., Grande, B., dan Simal, G. 2007. *Occurance of Fungicide and Insecticide Residues in Trades Samples of Leafy Vegetables*. *J. Foodchem*. 17(23):81-87
- Guo, X., Xueyin, Z., Cai, Q., Shen, T., dan Zhu, S. 2013. *Developing a Novel Sensitive Visual Screening Card for Rapid Detection of Pesticide Residues in Food*. *Food Control* 30 (1): 15–23. doi:10.1016/j.foodcont.2012.07.015.
- Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117-135.
- Justino, L., Santos, T., Duarte, A., dan Teresa, R. 2010. *Review of Analytical Figures of Merit of Sensors and Biosensors in Clinical Applications*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29 (10): 1172–83. doi:10.1016/j.trac.2010.07.008.
- Kavruk, M., Ozalp, V., dan Oktem, H. 2013. *Portable Bioactive Paper-Based Sensor for Quantifiaction of Pesticide*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 19(2): 17-25
- Lan, W. Chen, G., Cui, F., Tan, F., Ran, L., dan Yushupujiang, M. 2012. *Development of a Novel Optical Biosensor for Detection of Organophosphorus Pesticides Based on Methyl Parathion Hydrolase Immobilized by Metal-Chelate Affinity*. *Sensors* 12 (12): 8477–90. doi:10.3390/s120708477.
- Lu, S., Qian, J., Wu, Z., Ye, W., dan Zhang, K. 2009. *Application of Statistical Method to Evaluate Immobilization Variables of Trypsin Entrapped with Sol-gel Method*. *J. Biochem Tech* 1(3): 79-84
- Luckham, R. Dan Brennan, J. 2010. *Bioactive Paper Dipstick Sensor for Acetylcholinesterase Inhibitors Besed on Sol-gel/Enzyme/Gold Nanoparticle Composite*. *Analyst* (135): 2028-2035
- Malhotra, B. dan Turner, A. 2003. *Advance in Biosensor: Perspective Biosensor*. Amsterdam: Elsevier Science

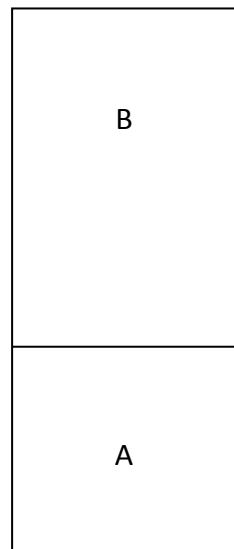
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Carrilho, E., Thomas III, S. W., Sindi, H., and Whitesides, G. M. 2008. *Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis*. *Analytical chemistry*, 80(10), 3699-3707.
- Miskiyah dan Munarso, S. 2009. *Kontaminasi Residu Pestisida pada Cabai Merah, Selada, dan Bawang Merah (Studi Kasus di Bandung dan Brebes Jawa Tengah serta Cianjur Jawa Barat)*. *J. Hort.* 19(1):101-111
- Morrel, D. 2002. *Catalysis of Organic Reactions*. New York: Marcel Dekker, Inc
- Montgomery, C. Douglas. 2009. *Statistical Quality Control (6th ed)*. Asia : John. Wiley & Sons
- Mulchandani, A., Wilfred, S., Joseph, W., dan Kim, R. 2001. *Biosensors for Direct Determination of Organophosphate Pesticides*. *Biosensors and Bioelectronics* 16 (4–5): 225–30.
- Permentan, 2007. Peraturan Menteri Pertanian No.07/Permentan/SR.140/2007 tentang Syarat dan Tatacara Pendaftaran Pestisida.
- Purves, Dale, ed. 2008. *Neuroscience*. 4th ed. Sunderland, Mass: Sinauer.
- Rukmana, Rahmat. 2003. *Jeruk Nipis, Prospek Agribisnis, Budi Daya dan Pasca Panen*. Yogyakarta: Penerbit Kanisus
- Sahin, F., Demirel, G., dan Tumturk, H. 2005. *A Novel Matrix for the Immobilization of Acetylcholinesterase*. *Ijbiomac*(37): 148-153
- Sakka, Sumio, 2005. *Handbook of Sol-gel Science and Technology Vol III: Processing, Characterizing, and Applications*. Boston: Kluwer Academic Publisher
- Sakti, V. 2017. *Elaborasi Prototype RAPDE (Rapid Pesticide Kit): Biosensor Pendeteksi Residu Pestisida secara Kualitatif pada Sayuran berbasis Kolorimetri*. Skripsi. Malang: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya
- Sassolas, A., Simon, B., Marty, J. 2012. *Biosensors for Pesticide Detection: New Trends*. *American Journal of Analytical Chemistry* 3: 210-232
- Shin, S., Wu, P., dan Chen, C. 2001. *Biochemical Studies of the Actions of Ethanol on Acetylcholinesterase Activity: Ethanol-Enzyme-Solvent Interaction*. *Intl J. Biochem.* (23):169-174
- Souza, Ranyere L., Emanuelle L. P. Faria, Renan T. Figueiredo, Alini T. Fricks, Gisella M. Zanin, Onélia A. A. Santos, Álvaro S. Lima, dan Cleide M. F. Soares. 2014. *Use of Polyethylene Glycol in the Process of Sol-gel Encapsulation of Burkholderia Cepacia Lipase*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 117 (1): 301–6. doi:10.1007/s10973-014-3663-0.

- Sotiropoulou, S., Nikos, A, dan Chaniotakis. 2005. *Tuning the Sol-gel Microenvironment for Acetylcholinesterase Encapsulation*. *Biomaterials* (26): 6771-6779
- Tougu, V. 2001. *Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition*. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents* 1 (2): 155–70. doi:10.2174/1568015013358536.
- Vamavakiki, V., Sotiropoulou, S., dan Chaniotakis. 2005. *Stabilization of Enzyme in Nanoporous Materials for Biosensor Application*. *Biosens Bioelectron* (20):1674-1682
- Whittaker, Victor P. 1990. *The Contribution of Drugs and Toxins to Understanding of Cholinergic Function*. *Trends in Pharmacological Sciences* 11 (1): 8–13. doi:10.1016/0165-6147(90)90034-6.
- WHO. 2006. *Sound Management of Pesticides And Diagnosis And Treatment Of Pesticide Poisoning*
- Yaser A. Yousef, dan Talal. S. Akasheh. 2011. *Photolysis of Some Benzimidazole Based Pesticides*. INTECH Open Access Publisher.
- Yuantari, Maria G. C., Widianarko, B., Sunoko, Henna. 2015. *Analisis Risiko Paparan Pestisida Terhadap Kesehatan Petani*. *KEMAS* 10 (2): 239-245
- Yusnani. 2013. *Identifikasi Residu Pestisida Golongan Organofosfat Pada Sayuran Kentang di Swalayan Lottemart dan Pasar Terong Kota Makassar Tahun 2013*. Skripsi. Makassar: Fakultas Kesehatan Masyarakat, UNHAS
- Zhang, L., Cao, X., Wang, L., dan Zhao, X. 2015. *Printed Microwells with Highly Stable Thin-film Enzyme Coating for Point-of-Care Multiplex Bioassay of Blood Samples*. *Analyst* 140(12):4105-4113

# **LAMPIRAN**



## Lampiran 1. Gambar Rancangan Desain Biosensor



### Keterangan:

- A. Zona reaksi yang terdiri dari campuran sol-gel, enzim asetilkolinesterase, dan kromofor indoxyl acetate
- B. Pegangan

## Lampiran 2. Prosedur Analisis Data

### 2.1 Uji Jumlah Enzim Terimobilisasi (modifikasi Lu *et al.*, 2009)

- a. Biosensor yang sudah diproduksi direndam dalam buffer Tris-CL 20 mM pH 7,5 sebanyak 250  $\mu$ l dan dilakukan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang.
- b. Dilakukan pembacaan absorbansi mikroplate kosong dengan menggunakan mikroplate reader panjang gelombang 630 nm.
- c. Hasil rendaman buffer diambil sebanyak 250  $\mu$ l pada masing-masing sampel dan dimasukkan dalam mikroplate panjang gelombang 630 nm.. Hasil rendaman tersebut diasumsikan sebagai enzim yang lisis atau tidak terimobilisasi oleh sol-gel dan tidak terikat pada kertas Whatman NO. 1.
- d. Pada mikroplate yang berisi buffer rendaman ditetaskan indoxyl acetate sebanyak 5  $\mu$ l. Dilakukan pembacaan absoroansi dengan menggunakan mikroplate reader panjang gelombang 630 nm setiap 2 menit selama 20 menit.
- e. Sedangkan untuk *free enzyme* dilakukan hal yang sama seperti di atas akan tetapi, enzim tidak diimobilisasi sehingga enzim langsung ditetaskan pada mikroplate.

- f. Hasil absorbansi dimasukkan pada persamaan di bawah, dengan keterangan sebagai berikut.  $\Delta A_0$  merupakan absorbansi enzim bebas, sedangkan  $\Delta A_1$  merupakan absorbansi enzim yang lisis dalam buffer rendaman.

$$\text{Jumlah Enzim Terimobilisasi (\%)} = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_1}{\Delta A_0} \times 100\%$$

## 2.2 Uji Aktivitas Relatif Enzim Terimobilisasi

- Pada biosensor yang telah difabrikasi, dilakukan perendaman pada buffer Tris-HCl pH 7,5 sebanyak 250  $\mu\text{l}$  selama 15 menit. Fungsi perendaman ini adalah untuk melepaskan enzim yang lisis atau enzim yang tidak terimobilisasi oleh sol-gel.
- Setelah itu, hasil rendaman diambil sebanyak 190  $\mu\text{l}$  dan dimasukkan ke dalam sumuran *microplate*. Selanjutnya, pada *microplate* ditambahkan enzim asetilkolinesterase sebanyak 5  $\mu\text{l}$  dan ditambahkan *indoxyl acetate* 5 mg/ml sebanyak 5  $\mu\text{l}$ .
- Dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 630 nm. Pembacaan absorbansi tersebut dilakukan selama 20 menit setiap 2 menit sekali.
- Hasil absorbansi tersebut diasumsikan menjadi absorbansi enzim yang lisis, kemudian dilakukan perhitungan untuk menghitung laju awal reaksi ( $V_0$ ). Laju awal reaksi ( $V_0$ ) merupakan perubahan absorbansi per satuan waktu, dalam hal ini yaitu  $A_{630}/\text{menit}$ . Laju awal dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$V_0 = \frac{A_0 - A_{20}}{t_0 - t_{20}}$$

Keterangan pada rumus tersebut adalah  $A_0$  merupakan absorbansi enzim bebas menit ke-0,  $A_{20}$  merupakan absorbansi enzim pada menit ke-20,  $t_0$  merupakan waktu menit ke-0, dan  $t_{20}$  merupakan waktu yang dibutuhkan sampai pengukuran absorbansi terakhir yaitu 20 menit.

- Selanjutnya, dilakukan perhitungan aktivitas relatif enzim bebas ( $V_b$ ) dengan menghitung konsentrasi produk yang dihasilkan per satuan waktu dengan rumus yang menggunakan prinsip Hukum Lambert-Beer sebagai berikut.

$$V_b \text{ (mM/menit)} = \frac{V_0 \times \text{Volume larutan}}{\epsilon l}$$

Pada rumus tersebut,  $V_0$  merupakan laju awal reaksi enzim dalam satuan  $A_{630}$ /menit, volume larutan merupakan volume larutan yang digunakan dalam sumuran *microplate* yaitu 200  $\mu$ l,  $\epsilon$  merupakan koefisien ekstingsi indoksil asetat yaitu 3,9 /mM cm, dan  $l$  merupakan tinggi larutan dalam sumuran *microplate*.

- f. Dilakukan hal yang sama untuk mengukur aktivitas relatif enzim bebas, akan tetapi pada enzim bebas tidak dilakukan perlakuan imobilisasi enzim pada media sol-gel.
- g. Setelah itu, hasil dari aktivitas enzim bebas dan enzim lisis dimasukkan pada rumus aktivitas relatif enzim terimobilisasi sebagai berikut.

$$\text{Aktivitas relatif enzim terimobilisasi (\%)} = \frac{V_b - V_{\text{lis}}}{V_b} \times 100\%$$

Pada rumus tersebut,  $V_b$  merupakan aktivitas enzim bebas sedangkan  $V_{\text{lis}}$  merupakan aktivitas enzim lisis atau enzim yang tidak terimmobilisasi oleh sol-gel.

### 2.3 Uji Waktu Respon Terhadap Substrat (Guo *et al.*, 2013)

- a. Biosensor yang telah diproduksi, ditetaskan larutan indoxyl acetate sebanyak 5  $\mu$ l dan ditunggu hingga kering (20 menit)
- b. Biosensor dimasukkan ke dalam plastik *zip lock* dengan menggunakan pinset.
- c. Dimasukkan ke dalam mesin *scanner* dilakukan *scan* pada menit ke 0,2,4,6,8,10
- d. Hasil pemindaian diolah dengan menggunakan *image editor* Adobe Photoshop CS6.
- e. Nilai “Mean” yang mewakili kecepatan reaksi akan muncul pada kotak dialog histogram.

### 2.3 Stabilitas Enzim Terhadap Suhu (Martinez *et al.*, 2008)

- a. Biosensor yang sudah diproduksi dimasukkan dalam plastik *zip lock*, dimasukkan dalam cawan petri tertutup dan dilapisi dengan plastik *wrap*.
- b. Diletakkan dalam kulkas ( $-4^{\circ}\text{C}$ ), inkubator ( $30^{\circ}\text{C}$ ) dan ruang terbuka laboratorium ( $25^{\circ}\text{C}$ ) dan dibiarkan selama 24 jam.
- c. Cawan petri dibuka dan ditetaskan indoxyl acetate pada biosensor sebanyak 10  $\mu$ l,

- d. Biosensor dimasukkan ke dalam plastik *zip lock* dengan menggunakan pinset.
- e. Dimasukkan ke dalam mesin *scanner* dilakukan *scan* pada detik ke 30, 60, 90, 120, 150.
- f. Hasil pemindaian diolah dengan menggunakan *image editor* Adobe Photoshop CS6.
- g. Nilai “Mean” yang mewakili kecepatan reaksi akan muncul pada kotak dialog histogram.

## 2.5 Uji Akurasi Biosensor

- a. Membuat regresi linear dari nilai *mean* pada pengujian LoD sehingga diperoleh persamaan  $y = ax + b$ . Dimana nilai  $y$  adalah nilai *mean*, dan nilai  $x$  adalah nilai konsentrasi pestisida.
- b. Membuat larutan pestisida dengan konsentrasi 2 ppm.
- c. Biosensor yang telah diproduksi, ditetaskan larutan pestisida 2 ppm dengan volume 15  $\mu$ l yang diulang sebanyak 4 kali setiap 5 menit pada zona reaksi biosensor.
- d. Diamati perubahan warna yang terjadi selama 20 menit.
- e. Dimasukkan ke dalam plastik, dan dipindai menggunakan *scanner* dan dilapisi kertas berwarna hitam sebagai *background*.
- f. Dikuantifikasikan menggunakan aplikasi Adobe Photoshop CS 3. Langkah selanjutnya sama dengan uji waktu respon biosensor poin c, d, e, dan f.
- g. Selanjutnya nilai *mean* yang diperoleh dimasukkan kedalam persamaan regresi linear. Hasilnya dibandingkan dengan konsentrasi pestisida sebenarnya.
- h. Dihitung prosentase akurasi. Secara matematis dirumuskan sebagai berikut:

$$Akurasi (\%) = \frac{X_1}{X_0} \times 100\%$$

Dimana,

$X_1$  = nilai konsentrasi pestisida hasil analisis

$X_0$  = nilai konsentrasi pestisida yang sebenarnya

### Lampiran 3. Data Volume TEOS dan H<sub>2</sub>O Pada Setiap Rancangan RSM

Std.	Rasio Molar		Volume yang Digunakan	
	TEOS	H <sub>2</sub> O	Volume TEOS (μl)	Volume H <sub>2</sub> O (μl)
1	1	4	83,15	26,85
2	1	12	55,87	54,13
3	1	4	83,15	26,85
4	1	12	55,87	54,13
5	1	2,34	17,48	92,52
6	1	13,66	52,31	57,69
7	1	8	66,83	43,16
8	1	8	66,83	43,16
9	1	8	66,83	43,16
10	1	8	66,83	43,16
11	1	8	66,83	43,16
12	1	8	66,83	43,16
13	1	8	66,83	43,16

Cara Perhitungan Rasio Molar TEOS:H<sub>2</sub>O Untuk Rasio Molar 1:4

a) TEOS

$$\begin{aligned} \text{mol} &= \text{gr} / \text{mr} \\ 1 &= \text{gr} / 208 \\ \text{gr} &= 208 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{massa jenis} &= \text{gr} / \text{Volume} \\ 0,933 &= 208 / \text{Volume} \\ V &= 208 / 0,933 \\ V &= 222,937 \text{ ml} \end{aligned}$$

b) H<sub>2</sub>O

$$\begin{aligned} \text{mol} &= \text{gr} / \text{mr} \\ 4 &= \text{gr} / 18 \\ \text{gr} &= 72 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{massa jenis} &= \text{gr} / \text{Volume} \\ 1 &= 72 / \text{Volume} \\ V &= 72 / 1 \\ V &= 72 \text{ ml} \end{aligned}$$

Perbandingan Volume:

a) TEOS

$$\frac{\text{Volume TEOS}}{\text{Volume TEOS} + \text{Volume H}_2\text{O}} \times 0,11$$

$$\begin{aligned}
&= \frac{222,937}{222,937 + 72} \times 0,11 \\
&= 0,08315 \text{ ml} \\
&= 83,15 \mu\text{l}
\end{aligned}$$

b) H<sub>2</sub>O

$$\begin{aligned}
&\frac{\text{Volume H}_2\text{O}}{\text{Volume TEOS} + \text{Volume H}_2\text{O}} \times 0,11 \\
&= \frac{72}{222,937 + 72} \times 0,11 \\
&= 0,02685 \text{ ml} \\
&= 26,85 \mu\text{l}
\end{aligned}$$

#### Lampiran 4. Hasil Absorbansi Rancangan RSM

RUN	mikroplate kosong	buffer rendaman	OD menit 20
1	0,028	0,035	0,053
1	0,031	0,035	0,054
2	0,029	0,032	0,054
2	0,027	0,032	0,053
3	0,028	0,032	0,052
3	0,029	0,033	0,054
4	0,029	0,034	0,055
4	0,03	0,034	0,054
5	0,031	0,033	0,051
5	0,031	0,035	0,05
6	0,029	0,034	0,056
6	0,03	0,035	0,055
7	0,03	0,033	0,049
7	0,03	0,031	0,049
8	0,029	0,032	0,046
8	0,029	0,031	0,048
9	0,028	0,033	0,054
9	0,028	0,032	0,053
10	0,029	0,032	0,045
10	0,03	0,031	0,047
11	0,027	0,033	0,057
11	0,029	0,033	0,058
12	0,031	0,032	0,042
12	0,03	0,032	0,045
13	0,028	0,03	0,049

Keterangan Setiap RUN yang diberi *highlight* merupakan data *center* rancangan dan setiap rancangan dilakukan duplo

## Lampiran 5. Hasil Perhitungan Pemilihan Model untuk Respon Jumlah Enzim Terimobilisasi

a. Hasil pemilihan model berdasarkan uraian jumlah kuadrat

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	db	Mean Kuadrat	F Hitung	Nilai P Prob>F	Keterangan
Mean vs Total	66743,12	1	66743,12			
Linear vs Mean	101,99	2	51,00	0,408	0,6756	
2FI vs Linear	168,05	1	168,05	1,398	0,2674	
<u>Quadratic vs 2FI</u>	<u>909,34</u>	<u>2</u>	<u>454,67</u>	<u>18,427</u>	<u>0,0016</u>	<u>Suggested</u>
Cubic vs Quadratic	65,62	2	32,81	1,532	0,3028	Aliased
Residual	107,10	5	21,42			
Total	68095,22	13	5238,09			

b. Hasil pemilihan model berdasarkan pengujian ketidaktepatan model

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	db	Mean Kuadrat	F-Hitung	Nilai P Prob>F	Keterangan
Linear	1148,26	6	191,38	7,516	0.0356	
2FI	980,21	5	196,04	7,699	0.0352	
<u>Quadratic</u>	<u>70,87</u>	<u>3</u>	<u>23,62</u>	<u>0,928</u>	<u>0.5047</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	5,25	1	5,25	0,206	0.6733	Aliased
Pure Error	101,85	4	25,46			

c. Hasil pemilihan model berdasarkan uraian ringkasan model secara statistic

Sumber Keragaman	Standar Deviasi	R <sup>2</sup>	Adjusted R <sup>2</sup>	Prediksi R <sup>2</sup>	PRESS	Keterangan
Linear	11,181	0,075	-0,109	-0,580	2135,788	
2FI	10,965	0,200	-0,067	-0,684	2277,045	
<u>Quadratic</u>	<u>4,967</u>	<u>0,872</u>	<u>0,781</u>	<u>0,510</u>	<u>663,090</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	4,628	0,921	0,810	0,634	495,162	Aliased

## Lampiran 6. Hasil Perhitungan Pemilihan Model untuk Respon Aktivitas Enzim Terimobilisasi

a. Hasil pemilihan model berdasarkan uraian jumlah kuadrat

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	db	Mean Kuadrat	F Hitung	Nilai P Prob>F	Keterangan
Mean vs Total	54726,54	1	54726,54			
Linear vs Mean	177,54	2	88,77	0,611	0,5621	
2FI vs Linear	78,28	1	78,28	0,512	0,4923	
<u>Quadratic vs 2FI</u>	<u>917,14</u>	<u>2</u>	<u>458,57</u>	<u>7,004</u>	<u>0,0214</u>	<u>Suggested</u>
Cubic vs Quadratic	97,50	2	48,75	0,676	0,5499	Aliased
Residual	360,79	5	72,16			
Total	56357,80	13	4335,22			

b. Hasil pemilihan model berdasarkan pengujian ketidaktepatan model

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	db	Mean Kuadrat	F-Hitung	Nilai P Prob>F	Keterangan
Linear	1358,56	6	226,43	9,518	0,0235	
2FI	1280,29	5	256,06	10,764	0,0195	
<u>Quadratic</u>	<u>363,14</u>	<u>3</u>	<u>121,05</u>	<u>5,088</u>	<u>0,0750</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	265,64	1	265,64	11,167	0,0288	Aliased
Pure Error	95,15	4	23,79			

c. Hasil pemilihan model berdasarkan uraian ringkasan model secara statistik

Sumber Keragaman	Standar Deviasi	R <sup>2</sup>	Adjusted R <sup>2</sup>	Prediksi R <sup>2</sup>	PRESS	Keterangan
Linear	12,057	0,109	-0,069	-0,549	2527,10	
2FI	12,362	0,157	-0,124	-0,551	2529,48	
<u>Quadratic</u>	<u>8,091</u>	<u>0,719</u>	<u>0,518</u>	<u>-0,674</u>	<u>2731,04</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	8,495	0,779	0,469	-9,513	17149,62	Aliased

## Lampiran 7. Data Hasil Verifikasi Jumlah Enzim Terimobilisasi dan Aktivitas Enzim Terimobilisasi

Jumlah Enzim Terimobilisasi (%)				Aktivitas Enzim Terimobilisasi (%)			
Ulangan 1	Ulangan 2	Rerata	Standar Deviasi	Ulangan 1	Ulangan 2	Rerata	Standar Deviasi
80,88	87,3	84,09	3,21	66,94	74,56	70,45	3,81



## Lampiran 8. Data Analisa Kualitas Biosensor

### a. Pengaruh Jenis Kertas Terhadap Hasil Absorbansi Buffer Rendaman

Jenis Kertas	Ulangan I	Ulangan II	Rerata Absorbansi pada 630 nm
Whatman No. 1	0,055	0,046	0,051
Whatman No. 41	0,059	0,057	0,058
Whatman No. 42	0,084	0,064	0,074
Whatman No. 91	0,062	0,068	0,065

### b. Hasil pengujian Limit of Detection (residu pestisida profenofos)

Konsentrasi Pestisida	Ulangan I	Ulangan II	Rerata Nilai Mean
0 ppm	188,63	189,97	189,30
1 ppm	200,31	202,35	201,33
5 ppm	206,84	208,90	207,87
10 ppm	252,67	254,25	253,46
25 ppm	240,79	243,09	241,94
200 ppm	254,74	247,38	246,56

### c. Hasil pengujian waktu respon terhadap substrat *indoxyl acetate*

Menit ke-	Ulangan I	Ulangan II	Rerata Nilai Mean
0	253,84	255,52	254,68
2	252,79	254,13	253,46
4	252,34	250,16	251,52
6	251,63	249,41	250,52
8	243,61	246,01	244,81
10	232,15	230,29	231,22

### d. Hasil rerata nilai mean untuk uji akurasi

Konsentrasi Pestisida	Ulangan I	Ulangan II	Rerata Nilai Mean
0 ppm	188,89	185,53	187,21
1 ppm	191,44	194,08	192,76
2 ppm	199,00	195,44	197,22
3 ppm	202,79	200,77	201,78
4 ppm	203,98	208,42	206,20
5 ppm	206,36	209,66	208,01

### e. Rerata Nilai Mean Biosensor ditambah 1 dan 2 ppm Pestisida Profenofos

Konsentrasi Pestisida	Ulangan I	Ulangan II	Rerata Nilai Mean
1 ppm	192,19	193,33	192,76
2 ppm	198,17	196,27	197,22

### f. Rerata Nilai Mean Biosensor Pada Aplikasi Selada Organik

Konsentrasi Pestisida	Ulangan I	Ulangan II	Rerata Nilai Mean
1 ppm	191,02	192,94	191,98
5 ppm	205,41	207,55	206,48
10 ppm	225,83	223,59	224,71

g. Rerata Nilai Mean Biosensor Pada Aplikasi Selada di Pasar Dinoyo

Konsentrasi Pesticida	Ulangan I	Ulangan II	Rerata Nilai Mean
Kontrol	188,98	186,87	187,92
Selada 1	194,53	192,39	193,46
Selada 2	187,34	189,28	188,31
Selada 3	204,91	208,13	206,52
Selada 4	200,89	202,73	201,81
Selada 5	190,17	187,57	188,87

**Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian**



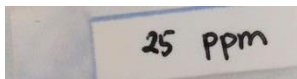
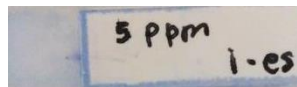
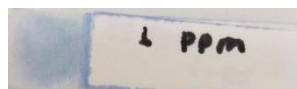
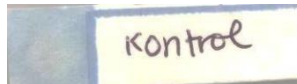
a. Gambar sayur selada organik merek Kaliandra segar



b. Gambar sayur selada organik merek Kaliandra setelah disemprot dengan pestisida Callicron 5000 EC (bahan aktif profenofos) konsentrasi 1 ppm



- c. Gambar sayur selada yang telah dicacah setelah inkubasi 24 jam di suhu ruang dan direndam dalam buffer Tris-Cl 20 mM pH 7,5



- d. Gambar perbedaan warna pada zona reaksi biosensor kontrol (tanpa residu pestisida) serta biosensor yang diaplikasikan pestisida Callicron 500 EC dengan konsentrasi 1,5, dan 25 ppm